MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER GENE FHUA, FHUC UND FHUD DES FERRI-HYDROXAMAT-TRANSPORTSYSTEMS BEI E. COLI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
RENATE BURKHARDT
aus Freudenstadt

1988

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER GENE FHUA, FHUC UND FHUD DES FERRI-HYDROXAMAT-TRANSPORTSYSTEMS BEI E.COLI

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS

DER NATURWISSENSCHAFTEN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT

VON

RENATE BURKHARDT

AUS FREUDENSTADT

1988

Tag der mündlichen Prüfung:	24. 06. 1987
Dekan:	Professor Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich für die Überlassung des Themas, für die ständige und freundliche Gesprächsbereitschaft und die großzügige finanzielle Unterstützung, besonders während der Etablierung der DNA Sequenzierung.

Herrn Prof. Dr. K. Hantke. Herrn Dr. E. Fischer und Herrn Priv. Doz. Dr. K. Heller danke ich für die vielen Ratschläge und Anregungen, die zum Gelingen mancher Experimente beitrugen.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Frau Dr. I. Riede für die Einführung in die Technik der DNA Sequenzierung,

Herrn W. Tröger für die Anfertigung der Hydrophobizitätsanalysen,

meinem Laborkollegen Sven Schäffer für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre während der gemeinsamen Laborzeit,

Frau Dr. L. Zimmermann, Herrn U. Preßler und Frau K. Eick-Helmerich für zahlreiche praktische Hinweise und moralische Unterstützung

Frau M. Schneider und Frau H. Bausinger für die schnelle Erledigung aller Sekretariatsarbeiten.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Material	4
2.1.1.	Chemikalien	4
2.1.2.	Nährmedien und Puffer	5
2.1.3.	Bakterienstämme	6
2.2.	Methoden	7
2.2.1.	Kulturbedingungen	7
2.2.2.	Wachstums- und Phagentests	7
2.2.3.	Molekularbiologische Techniken	7
2.2.4.	DNA Sequenzierung	8
2.2.5.	Expression plasmidkodierter Proteine unter Verwendung des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems	8
2.2.6.	Membrantrennung radioaktiv markierter Zellen	9
2.2.7.	Isolierung periplasmatischer Proteine	9
2.2.8.	Schnellpräparation der äußeren Membran von *E. coli*	10
2.2.9.	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	10
3.	ERGEBNISSE	11
3.1.	Nukleotidsequenz des *fhuA* Gens	11
3.2.	Aminosäuresequenz von FhuA	20
3.3.	Versuche zur Eingrenzung des Promotorbereichs und der Fur Bindestelle des *fhuA* Gens	24
3.4.	Klonierung und Komplementation des *fhuC* Locus	26
3.5.	Nukleotidsequenz der *fhuC* Region	28
3.6.	Aminosäuresequenz von FhuC	31
3.7.	Nukleotidsequenz der *fhuD* Genregion	36
3.8.	Aminosäuresequenz des FhuC Proteins	39
3.9.	Lokalisierung von FhuD mit dem T7 System	41
4.	DISKUSSION	42
5.	ZUSAMMENFASSUNG	49
6.	LITERATUR	51
7.	ANHANG	63
	Plasmidkonstruktionen	63

1. EINLEITUNG

Gramnegative Bakterien wie Escherichia coli sind gegen ihre Umwelt durch eine Zellhülle abgegrenzt, die aus äußerer Membran, Mureinschicht, Periplasma und cytoplasmatischer Membran aufgebaut ist und eine funktionelle Einheit darstellt (18). Die äußere Membran bildet eine Permeationsbarriere für Makromoleküle und hydrophile Substanzen (32). Ungeladene und hydrophile Moleküle mit einer Ausschlußgrenze von 600 - 700 Dalton können die äußere Membran über unspezifische Proteinkanäle wie OmpC und OmpF ungehindert passieren. Gleichzeitig dienen diese Hauptproteine bestimmten Phagen als Rezeptoren (54). Außer diesen unspezifischen Porinen gibt es noch eine Anzahl weiterer "Nebenproteine" in der äußeren Membran, die in geringerer Kopienzahl vorliegen und deren Expression stark von den Kulturbedingungen abhängt (82). Dazu gehören Porenproteine wie PhoE (Phosphattransport), LamB (Maltoseaufnahme) und Tsx (Nukleosidaufnahme) und hochspezifische Rezeptoren für Transportsysteme.
Struktur und Funktion der äußeren Membran sind ausführlich beschrieben in (18, 21, 84, 101).

Ein wesentliches Element für das Wachstum von Bakterien mit Ausnahme der Lactobacillen ist das Eisen, das als Eisen-Schwefel-Protein der Elektronentransportkette und in cytoplasmatischen Enzymen an vielen Redoxreaktionen beteiligt ist. Eisen kommt in der Natur zwar häufig vor, bildet aber unter physiologischen Bedingungen schwerlösliche Eisen(III)-Hydroxy-Aquo-Komplexe (117). Die verfügbare freie Eisenkonzentration von 10^{-18}M liegt weit unter der von Mikroorganismen benötigten Minimalkonzentration von 0,1 - 1 µM (21). Ähnliche Bedingungen finden Bakterien in Körperflüssigkeiten von Vertebraten vor. Dort ist Eisen an die hochaffinen Trägerproteine Transferrin und Lactoferrin gebunden (28). Die Eisenversorgung von Bakterien stellt somit auch einen wichtigen Pathogenitäts- und Virulenzfaktor dar (16,30,107,129).
Auf diese Herausforderung reagieren aerob wachsende Mikroben mit der Synthese und Ausscheidung hochaffiner Chelatoren, die

Eisen komplexieren und über spezifische Transportsysteme in die Zelle aufnehmen.
Escherichia coli verfügt über fünf bisher bekannte hochaffine Eisentransportsysteme, die in (14,15,20,22,23,97) näher beschrieben sind. Sie unterliegen einer übergeordneten Kontrolle durch das Fur-Genprodukt und werden unter Eisenmangel dereprimiert (55, 56,57,112). Außerdem benötigen sie die tonB- und die exbB-Funktion (45,59).
Als Chelatoren kann die Zelle drei verschiedene Substanzen verwenden (96).
Eisen-Dicitrat wird über den FecA Rezeptor(80K) und die Genprodukte FecB (Periplasma) und FecC (Cytoplasmamembran) aufgenommen(44,72,126,135).
Enterochelin, ein Komplexbildner vom Phenolsäure-Typ (100), wird von Escherichia coli selbst synthetisiert, über den FepA Rezeptor(81K) der äußeren Membran aufgenommen und über die bisher bekannten Genprodukte FepB und FepC der Cytoplasmamembran ins Zellinnere transportiert (53,89,102,103,106,132).
Die drei Komplexbildner Ferrichrom, Coprogen und Aerobactin sind Hydroxamate und werden von den hochspezifischen Rezeptorproteinen FhuA (78K), FhuE (76K) und Iut (74K) gebunden (9,51,57,75,123). Während die Translokation durch die Cytoplasmamembran in den meisten Fällen spezifisch für ein Substrat erfolgt, benutzen alle Eisenhydroxamate ein gemeinsames Transportsystem, das von den Genen fhuC, fhuD und fhuB kodiert wird (17,19,39,57).
Die fhu-Region wurde kloniert und die Genfolge als fhuACDB bestimmt (39). Durch Tn5 Mutagenese und Komplementationsstudien konnten die Gene grob gegeneinander abgegrenzt und die Transkriptionsrichtung für fhuA und fhuD festgelegt werden.
FhuA ist nicht nur Rezeptor für den Eisenchelator Ferrichrom, sondern bindet auch das strukturanaloge Antibiotikum Albomycin, Colicin M und die Phagen T5, T1 und Ø80 (20,24,25,61,128).
Durch die Annahme von Funktionsdomänen kann die Wechselwirkung eines Rezeptorproteins mit so vielen strukturell verschiedenen Molekülen erklärt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Nukleotidsequenz und damit die Primärstruktur des fhuA Gens mit seinen regulatori-

schen Elementen zu bestimmen, mit der Absicht, durch vergleichende Analysen mit anderen Rezeptorproteinen funktionsrelevante Homologien zu finden. Die Kenntnis der Basensequenz ist auch Grundlage für gezielte Mutagenesen solcher Domänen. Die Sequenz der Gene fhuC und fhuD sollte zeigen, ob das Hydroxamatsystem eher den Cytoplasmamembranproteinen von Bindeprotein abhängigen Transportsystemen oder Bindeprotein unabhängigen Permeasen ähnlich ist.
Die Analyse der intergenen Regionen auf DNA Ebene sollte Aufschluß über eventuell vorhandene auffällige Regulationselemente geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Amersham Buchler	^{35}S-Methionin, ^{35}S-dATP, Sequenzier-"Kit"
Biolabs, Inc.	15bp-"Primer"
Boehringer	DNase, Lysozym, Nukleotide, Proteinase K, Restriktionsendonukleasen, Ribonuklease, T4-DNA-Ligase, X-Gal, 7 deaza 2´dGTP
BRL	Formamid, HGT-Agarose, "Ultra pure" Harnstoff, "Ultra pure" Phenol
Difco	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, Nutrient Broth
LKB	Binde-Silan, Repel-Silan, Xylen-Cyanol
NEN	"Enlightening"
Pharmacia	FPLCpure Cloned Klenow Fragment
Serva	Acrylamid, Amberlite MB-1, Ammoniumpersulfat, Ampicillin, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Dithiothreitol, IPTG, PEG 6000, SDS, TMED, Triton X-100
Sigma	Ethidiumbromid, MOPS, Tetracyclin, Tris
Stehelin	Res triktionsendonuklease AsuII

Ferrichrom und Albomycin stammten aus Beständen des Instituts.

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

2.1.2. Nährmedien und Puffer

TY Medium	Bacto Trypton	10g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	5g
	mit deion H_2O auf 1l auffüllen	
NB Medium	Nutrient Broth	8g
	NaCl	5g
	mit deion H_2O auf 1l auffüllen	
M9 Salzlösung (10x)	Na_2HPO_4 x $2H_2O$	75g
	KH_2PO_4	30g
	NaCl	5g
	NH_4Cl	10g
	mit deion H_2= auf 1l auffüllen	
M9 Medium	deion H_2O	900ml
	M9 Salzlösung	100ml
	Glucose (40%)	10ml
	$MgSO_4$ (1M)	1ml
	$CaCl_2$ (0,1M)	1ml

Zur Herstellung von Nährplatten wurden 15g/l Bacto Agar zugesetzt.
Top Agar enthielt 6,5g/l Bacto Agar.

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben: 30µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Neomycin, 14µg/ml Tetracyclin.

Eisenmangelbedingungen wurden durch Zugabe von 200µM Dipyridyl zum Medium erzeugt.

TE Puffer	Tris/HCl	10mM
	EDTA	1mM
	pH7,5 - 8.0	

TE gesättigtes Phenol	Phenol	100g
	TE Puffer pH7,5	38ml
	Die Lösung wurde portioniert und bei -20°C aufbewahrt.	
Sequenzier Puffer (10x)	Tris	108g
	Borsäure	55g
	EDTA	9,3g
	mit deion. H_2O auf 1l auffüllen	
Triton Lysis Mix	Triton X-100	1ml
	EDTA (0,25M)	25ml
	Tris/HCl (1M) pH8	5ml
	deion. H_2O	63ml

2.1.3. Bakterienstämme

Stamm	genetische Merkmale	Herkunft
JM101	(lac pro) thi supE F'traD36 proAB $lacI^q$ z M15	Messing
LF947	recA minA minB lacY xyl thi mtl fepA12 fhuC12	Fecker
LF941	recA hsdM hsdR supE lacY leu thi pro aro fhuA32	Fecker
WM1576	Lambda+ relA1 pGP1-2	Tabor

2.1.4. Phagen

Phagenlysate der Phagen T5 und T1 wurden von Frau Krauel zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Kulturbedingungen

Vorkulturen wurden über Nacht bei 37°C in 3ml Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen.
Hauptkulturen wurden mit der entsprechenden Menge an Vorkultur auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Zellernte erfolgte je nach Versuchsanordnung in den entsprechenden Wachstumsphasen durch Zentrifugation.

2.2.2. Wachstums- und Phagentests

Auf Nutrient Broth Platten mit Zusatz von 200µM Dipyridyl wurde die Fähigkeit verschiedener Stämme zum Wachstum mit Ferrichrom geprüft. Dazu wurden 0,1ml ÜNK des Teststammes mit 3ml Weichagar, entsprechender Menge Antibiotikum und 200µM Dipyridyl schnell gemischt und auf eine Agarplatte gegossen. Nach Erstarren der Oberfläche wurden Filterplättchen aufgelegt, die mit 15µl Ferrichrom (1mM) getränkt waren. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.
Die Empfindlichkeit gegen Phagen wurde auf TY Platten mit Zusatz von Antibiotikum im Querstrichtest geprüft.

2.2.3. Molekularbiologische Techniken

Plasmidisolierungen wurden nach (11) durchgeführt. Zur Subklonierung und Sequenzierung verwendete DNA wurde über CsCl Gleichgewichtszentrifugation gereinigt (124). Fragmente der fhuACD Region wurden zur gezielten Klonierung und Sequenzierung aus 0,7 - 1,5% Agarosegelen isoliert (34). Plasmidverdau, Ligation und Gelelektrophorese wurden nach Maniatis et. al. (87) durchgeführt.
Transformation von Zellen erfolgte nach der Vorschrift von Dagert und Ehrlich (31).

2.2.4. DNA Sequenzierung

DNA Fragmente wurden in die replikative Form der Phagen M13 mp8, mp9, mp18 und mp19 kloniert (91,92). Die Vermehrung der Phagen erfolgte auf dem Stamm JM101. Einzelstrangige Templates wurden nach Vorschrift (115) präpariert und bei -20°C aufbewahrt. Die Sequenzierung wurde nach der Dideoxymethode von Sanger (110) mit ^{35}S-dATP (8) durchgeführt. Routinemäßig erfolgte die Annealing Reaktion mit dem 15bp Primer von Biolabs Inc., Schwalbach. Die Reaktionsmixe stammten aus dem Sequenzierungskit von Amersham-Buchler, Braunschweig. Für GC Bereiche, die schlecht lesbar waren, wurde dGTP der Mixe durch 7 deaza 2'dGTP in denselben Konzentrationen ersetzt. Die DNA Fragmente wurden mit dem Macrophor Elektrophoresesystem 2010 von LKB, Gräfelfing aufgetrennt (109, 4). Die Autoradiographie der getrockneten Gele erfolgte für 12 - 36 Stunden auf Cronex 4 Filmmaterial (Du Pont).

2.2.5. Expression plasmidkodierter Proteine unter Verwendung des T7 RNA Polymerase/Promotor Systems (122)

Der Stamm WM1576 wurde mit den Plasmiden pGP1-2 und pRB3 (SalI-EcoRI Fragment, Abb.10) transformiert. Die auf den Plasmiden kodierten Proteine wurden wie folgt exprimiert:
WM1576 (pGP1-2, pRB3) wurde über Nacht in TY Medium mit 40µg/ml Ampicillin und 40µg/ml Kanamycin bei 30°C angezogen. Frisches TY Medium mit Antibiotikazusatz wurde auf OD_{578} von 0,05 angeimpft und bei 30°C bis zur OD_{578} von 0,5 unter Schütteln kultiviert. 1ml Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit M9 Medium gewaschen und in 5ml M9 Medium mit 20µg/ml Thiamin und 0,01% 18 Aminosäuremix ohne Methionin und Cystein resuspendiert. Die Zellen wurden 60 Minuten bei 30°C geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 42°C gehalten. Nach Zugabe von Rifampicin (20mg/ml in Methanol) in einer Endkonzentration von 200µg/ml wurde zuerst 10 Minuten bei 42°C weiterinkubiert. Die Temperatur wurde für 20 Minuten auf 30°C abgesenkt. Je 1ml Zellen wurde in Eppendorfgefäßen für 5 Minuten bei 30°C mit

10µCi ^{35}S Methionin markiert. Für Gesamtzellpräparationen wurden die markierten Proben zentrifugiert, das Sediment wurde in 20µl TE Puffer resuspendiert und mit 20µl Auftragspuffer versetzt. Die Proben wurden bei - 20°C aufbewahrt.

2.2.6. Membrantrennung radioaktiv markierter Zellen

1ml Zellen wurden abzentrifugiert und in 20µl 0,2M Tris/HCl aufgenommen. Nach Zugabe von 40µl Tris/Sucrose (0,2M/1M) pH 8, 5µl Lysozym (4mg/ml) und 15µl 10mM EDTA pH 8 wurden die Proben zweimal eingefroren und aufgetaut. 1,3ml bidest. H_2O, 25µl 1M $MgCl_2$ und 5µg DNase wurden zugemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben 60 Minuten bei 18000 UpM zentrifugiert (Sorvall, SS34 Rotor mit Spezialeinsätzen für Eppendorfgefäße). Das Sediment ent enthält die Gesamtmembran und wurde in 100µl 0,2M Tris/HCl pH 8 resuspendiert. 20µl Probe wurden mit 20µl Auftragspuffer vermischt.
Die Präparation der äußeren und der cytoplasmatischen Membran wurde nach Schnaitman (113) durchgeführt:
80µl Gesamtmembran wurden mit 100µl Extraktionspuffer (50mM Tris/HCl, 10mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation (Eppendorf) wurde das Sediment, das die äußere Membran enthält, einmal mit 1ml bidest. H_2O gewaschen, in 20µl Tris/HCl aufgenommen und mit 20µl Probenpuffer gemischt.
Der Überstand (175µl) wurde mit 175µl Chloroform und 420µl Methanol schnell vermischt und 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment, das die Proteine der Cytoplasmamembran enthält, wurde ebenfalls in 0,2M Tris/HCl und Probenpuffer (1:1) gelöst.

2.2.7. Isolierung periplasmatischer Proteine (3)

3ml markierte Zellen wurden 10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden im verbliebenen Medium resuspendiert. 20µl Chloroform wurden

untergemischt. Nach 15 minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden 200µl 0,01M Tris/HCl pH 8 zugegeben. Die Proben wurden 20 Minuten bei 7000g (Sorvall, SS34 Rotor) zentrifugiert. Im Überstand enthaltene periplasmatische Proteine wurden mit zwei Volumina Ethanol über Nacht bei - 20°C gefällt, abzentrifugiert und in Probenpuffer aufgenommen.

2.2.8. Schnellpräparation der äußeren Membran

Die Zellen wurden in 40ml TY Medium mit und ohne Zusatz von 200µM Dipyridyl bis zur OD_{578} von 0,5 angezogen. Die Isolierung der äußeren Membran erfolgte genau nach Vorschrift (55). Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei - 20°C aufbewahrt.

2.2.9. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS PAGE wurde nach Lugtenberg et. al. (83) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration betrug 11 oder 15% bei einem Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid von 44 : 1. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem Lauf mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Radioaktiv markierte Proben wurden fluorographisch (Enlightning) nachgewiesen (12).

3. ERGEBNISSE

3.1. Nukleotidsequenz des fhuA Gens

Durch Komplementationsstudien (39) war bekannt, daß das Plasmid pPF3/V1, ein pBR322 Derivat mit einem 7,8kb großen Insert, in der Lage ist, Mutationen in den Loci fhuACDB zu komplementieren.
Die Sequenzierung des 5´angrenzenden ponA ponB Genbereichs (27) zeigte, daß der Genanfang von fhuA hinter der SphI Schnittstelle (Abb.10) liegen mußte. Das carboxyterminale Ende des Gens konnte durch das Plasmid pFB103 (39), welches eine Tn5 Insertion in unmittelbarer Nähe der SmaI Schnittstelle (Abb.10) trägt, eingegrenzt werden.
Zur Sequenzierung wurden aus dem Plasmid pPF3/V1 die 1,6kb großen SphI/SalI und 1,1kb großen SalI/SmaI Fragmente isoliert und zur Subklonierung von Sau3A, HpaII, RsaI oder TaqI Bruchstücken in die Phagen M13mp18 und mp19 verwendet. Die nach der Dideoxymethode von Sanger (110) sequenzierten DNA Klone sind in Abb. 1 dargestellt. Der Anschluß des 1,1kb großen SalI/SmaI Fragments an das 1,6kb große SphI/SalI Stück wurde durch die Sequenzierung des 830bp EcoRV/DraI Fragments (Abb.1) bestätigt.
Die in Abb. 3 gezeigte Nukleotidsequenz stimmt mit der von Coulton et al. (29) veröffentlichten überein und läßt ein großes offenes Leseraster von 2241bp erkennen, welches von Nukleotid 420 bis 2660 reicht. Auf demselben Strang liegen nur noch drei längere offene Leseraster von 170bp (NT 628 - 798), 438bp (NT 1192 - 1630) und 242bp (NT 2629 - 2877) ohne zugehörige regulatorische Sequenzen.
Das größte offene Leseraster beginnt mit ATG als Startcodon und hat im Abstand von 6bp eine Ribosomenbindestelle AGAGAT, die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz GGAGGT (116) zeigt.
-10 und -35 Regionen wurden anhand der Konsensussequenzen von Rosenberg und Court (108) bestimmt. Dabei lassen sich zwei Bereiche mit unterschiedlich guter Übereinstimmung finden (Tab.1).

Weiterhin auffällig sind zahlreiche Sekundärstrukturen in diesem Bereich (Abb.3). Ähnliche Strukturen sind auch für das Aerobactinoperon beschrieben (10), das in vitro zwei verschiedene Promotoren zur Transkription benützen kann. Auch sind in der 5'Region von fhuA drei längere Nukleotidfolgen von 11, 9 und 14bp doppelt vorhanden (Abb.3), deren Bedeutung jedoch unklar ist.
Ein Vergleich der 5'flankierenden Bereiche der Gene fhuA, fhuC (3.2.), fhuD (3.3.) und fhuB (78) des Operons ergab nur kurze Homologien zwischen fhuA, fhuC und fhuB (Abb.4) im Bereich der -10 Region.
Die kodierende Sequenz von fhuA endet mit dem Stopcodon TAA bei NT 2781. Daran schließt sich im Abstand von 11bp eine stabile stem and loop Struktur von 7 GC Paaren und einem AT Paar mit nachfolgender poly U Sequenz an (Abb.12), die einen rho unabhängigen Transkriptionsstop erlaubt, aber auch als Attenuator dienen kann. Attenuation als regulatorische Möglichkeit für nachgeschaltete Gene ist bei verschiedenen Biosynthese Operons bereits beschrieben (74).
Ein Vergleich der anschließenden nicht kodierenden 3'Region mit der Konsensussequenz repetitiver extragener Palindromsequenzen (7) ergab keine nennenswerte Übereinstimmung. REP Sequenzen liegen in der 3'Region verschiedener Gene von Operons (7,66,118), werden nicht translatiert und dienen der Stabilisierung der mRNA (98).

Tab. 1 : Sequenzen der -35 und -10 Regionen des fhuA Gens. Die Konsensussequenz wurde (108) entnommen.

	-35	-10
Konsensus:	TTGACAT	TATAAT
NT Position		
328	TTGCGAA	TATTAT
346	TTCGAAT	TATAAT

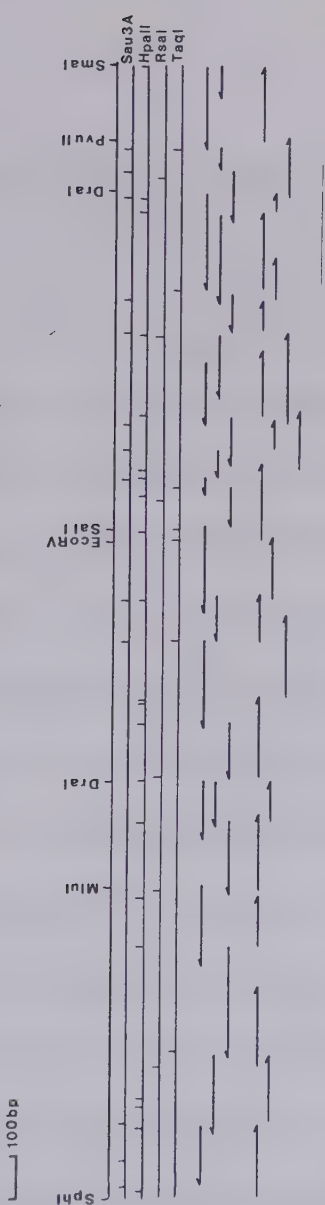


Abb. 1: Sequenzstrategie der fhuA Genregion. Die Pfeile geben Richtung und Länge der sequenzierten Klone an.

```
 SphI
GCATGCGTATCTTGCCGGTCTGGACCAGCGATCCGCAATCGCTGTGCCAGCAGAGCGAGATGCAGCAGCAGCCGT
                    100
CAGGCAATCCGTTTGATCAGTCTTCTCAGCCGCAGCAACAGCCGCAACAGCAACCTGCTCAGCAAGAGCAGAAAG
                                  200
ACAGCGACGGTGTAGCCGGTTGGATCAAGGATATGTTTGGTAGTAATTAACATCTAAGCGTGAAATACCGGATGC
                                                                        300
CGAGTTGCCATCCGCTAAAATAACATCCCATCTAAGATATTAACCCTTTCTTTTCATCTGGTTGTTTATTAACCC
TTCAGGAACGCTCAGATTGCGTACCGCTTGCGAACCCGCCAGCGTTTCGAATATTATCTTATCTTTATAATAATC
                    400
ATTCTCGTTTACGTTATCATTCACTTTACATCAGAGATATACCA    ATG GCG CGT TCC AAA ACT GCT
                                                fMet Ala Arg Ser Lys Thr Ala

CAG CCA AAA CAC TCA CTG CGT AAA ATC GCA GTT GTA GTA GCC ACA GCG GTT AGC GGC
Gln Pro Lys His Ser Leu Arg Lys Ile Ala Val Val Val Ala Thr Ala Val Ser Gly

500
ATG TCT GTT TAT GCA CAG GCA GCG GTT GAA CCG AAA GAA GAC ACT ATC ACC GTT ACC
Met Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Val Glu Pro Lys Glu Asp Thr Ile Thr Val Thr

                                                    600
GCT GCA CCT GCG CCG CAA GAA AGC GCA TGG GGG CCT GCT GCA ACT ATT GCG GCG CGA
Ala Ala Pro Ala Pro Gln Glu Ser Ala Trp Gly Pro Ala Ala Thr Ile Ala Ala Arg

CAG TCT GCT ACC GGC ACT AAA ACC GAT ACG CCG ATT CAA AAA GTG CCA CAG TCT ATT
Gln Ser Ala Thr Gly Thr Lys Thr Asp Thr Pro Ile Gln Lys Val Pro Gln Ser Ile

                        700
TCT GTT GTG ACC GCC GAA GAG ATG GCG CTG CAT CAG CCG AAG TCG GTA AAA GAA GCG
Ser Val Val Thr Ala Glu Glu Met Ala Leu His Gln Pro Lys Ser Val Lys Glu Ala

CTT AGC TAC ACG CCG GGT GTC TCT GTT GGT ACG CGT GGC GCA TCC AAC ACC TAT GAC
Leu Ser Tyr Thr Pro Gly Val Ser Val Gly Thr Arg Gly Ala Ser Asn Thr Tyr Asp

            800
CAC CTG ATC ATT CGC GGC TTT GCG GCA GAA GGC CAA AGC CAG AAT AAC TAT CTG AAT
His Leu Ile Ile Arg Gly Phe Ala Ala Glu Gly Gln Ser Gln Asn Asn Tyr Leu Asn

GGC CTG AAG TTG CAG GGC AAC TTC TAT AAC GAT GCG GTC ATT GAC CCG TAT ATG CTG
Gly Leu Lys Leu Gln Gly Asn Phe Tyr Asn Asp Ala Val Ile Asp Pro Tyr Met Leu

 900
GAA CGC GCT GAA ATT ATG CGT GGC CCG GTT TCC GTG CTT TAC GGT AAA AGC AGT CCT
Glu Arg Ala Glu Ile Met Arg Gly Pro Val Ser Val Leu Tyr Gly Lys Ser Ser Pro

                                                1000
GGC GGC CTG TTG AAT ATG GTC AGC AAG CGT CCG ACC ACC GAA CCG CTG AAA GAA GTT
Gly Gly Leu Leu Asn Met Val Ser Lys Arg Pro Thr Thr Glu Pro Leu Lys Glu Val

CAG TTT AAA GCC GGT ACT GAC AGC CTG TTC CAG ACT GGT TTT GAC TTT AGC GAT TCG
Gln Phe Lys Ala Gly Thr Asp Ser Leu Phe Gln Thr Gly Phe Asp Phe Ser Asp Ser

                        1100
TTG GAT GAT GAC GGT GTT TAC TCT TAT CGC CTG ACC GGT CTT GCG CGT TCT GCC AAT
Leu Asp Asp Asp Gly Val Tyr Ser Tyr Arg Leu Thr Gly Leu Ala Arg Ser Ala Asn
```

```
                        *                                   *                                   *
GCC CAG CAG AAA GGG TCA GAA GAG CAG CGT TAT GCT ATT GCA CCG GCG TTC ACC TGG
Ala Gln Gln Lys Gly Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Ala Ile Ala Pro Ala Phe Thr Trp

                              1200                                  *
CGT CCG GAT GAT AAA ACC AAT TTT ACC TTC CTT TCT TAC TTC CAG AAC GAG CCG GAA
Arg Pro Asp Asp Lys Thr Asn Phe Thr Phe Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Glu Pro Glu

 *                                  *                                   *
ACC GGT TAT TAC GGC TGG TTG CCG AAA GAG GGA ACC GTT GAG CCG CTG CCG AAC GGT
Thr Gly Tyr Tyr Gly Trp Leu Pro Lys Glu Gly Thr Val Glu Pro Leu Pro Asn Gly

  1300                              *                                   *
AAG CGT CTG CCG ACA GAC TTT AAT GAA GGG GCG AAG AAC AAC ACC TAT TCT CGT AAT
Lys Arg Leu Pro Thr Asp Phe Asn Glu Gly Ala Lys Asn Asn Thr Tyr Ser Arg Asn

        *                           *                                   1400
GAG AAG ATG GTC GGC TAC AGC TTC GAT CAC GAA TTT AAC GAC ACC TTT ACT GTG CGT
Glu Lys Met Val Gly Tyr Ser Phe Asp His Glu Phe Asn Asp Thr Phe Thr Val Arg

                  *                               *                   *
CAG AAC CTG CGC TTT GCT GAA AAC AAA ACC TCG CAA ACC AGC GTT TAT GGT TAC GGC
Gln Asn Leu Arg Phe Ala Glu Asn Lys Thr Ser Gln Asn Ser Val Tyr Gly Tyr Gly

                     *                                  1500                  *
GTC TGC TCC GAT CCG GCG AAT GCT TAC AGC AAA CAG TGT GCG GCA TTA GCG CCA GCG
Val Cys Ser Asp Pro Ala Asn Ala Tyr Ser Lys Gln Cys Ala Ala Leu Ala Pro Ala

                        *                                   *                   *
GAT AAA GGC CAT TAT CTG GCA CGT AAA TAC GTC GTT GAT GAT GAG AAG CTG CAA AAC
Asp Lys Gly His Tyr Leu Ala Arg Lys Tyr Val Val Asp Asp Glu Lys Leu Gln Asn

                              1600                                  *
TTC TCC GTT GAT ACC CAG TTG CAG AGC AAG TTT GCC ACT GGC GAT ATC GAC CAC ACC
Phe Ser Val Asp Thr Gln Leu Gln Ser Lys Phe Ala Thr Gly Asp Ile Asp His Thr

  *                  SalI          *                                   *
CTG CTG ACC GGT GTC GAC TTT ATG CGT ATG CGT AAT GAC ATC AAC GCC TGG TTT GGT
Leu Leu Thr Gly Val Asp Phe Met Arg Met Arg Asn Asp Ile Asn Ala Trp Phe Gly

    1700                            *                                   *
TAC GAC GAC TCT GTG CCA CTG CTC AAT CTG TAC AAT CCG GTG AAT ACC GAT TTC GAC
Tyr Asp Asp Ser Val Pro Leu Leu Asn Leu Tyr Asn Pro Val Asn Thr Asp Phe Asp

           *                                *                             1800
TTC AAT GCC AAA GAT CCG GCA AAC TCC GGC CCT TAC CGC ATT CTG AAT AAA CAG AAA
Phe Asn Ala Lys Asp Pro Ala Asn Ser Gly Pro Tyr Arg Ile Leu Asn Lys Gln Lys

                  *                               *                   *
CAA ACG GGC GTT TAT GTT CAG GAT CAG GCG CAG TGG GAT AAA GTG CTG GTC ACC CTA
Gln Thr Gly Val Tyr Val Gln Asp Gln Ala Gln Trp Asp Lys Val Leu Val Thr Leu

                     *                                  1900                  *
GGC GGT CGT TAT GAC TGG GCA GAT CAA GAA TCT CTT AAC CGC GTT GCC GGG ACG ACC
Gly Gly Arg Tyr Asp Trp Ala Asp Gln Glu Ser Leu Asn Arg Val Ala Gly Thr Thr

                        *                                   *
GAT AAA CGT GAT GAC AAA CAG TTT ACC TGG CGT GGT GGT GTT AAC TAC CTG TTT GAT
Asp Lys Arg Asp Asp Lys Gln Phe Thr Trp Arg Gly Gly Val Asn Tyr Leu Phe Asp

                              2000                                  *
AAT GGT GTA ACA CCT TAC TTC AGC TAT AGC GAA TCG TTT GAA CCT TCT TCG CAA GTT
Asn Gly Val Thr Pro Tyr Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Glu Pro Ser Ser Gln Val
```

```
                *                           *                           *
GGG AAG GAT GGT AAT ATT TTC GCA CCG TCT AAA GGT AAG CAG TAT GAA GTC GGC GTG
Gly Lys Asp Gly Asn Ile Phe Ala Pro Ser Lys Gly Lys Gln Tyr Glu Val Gly Val

     2100                          *                           *
AAA TAT GTA CCG GAA GAT CGT CCG ATT GTA GTT ACT GGT GCC GTG TAT AAT CTC ACT
Lys Tyr Val Pro Glu Asp Arg Pro Ile Val Val Thr Gly Ala Val Tyr Asn Leu Thr

               *                           *                          2200
AAA ACC AAC AAC CTG ATG GCG GAC CCT GAG GGT TCC TTC TTC TCG GTT GAA GGT GGC
Lys Thr Asn Asn Leu Met Ala Asp Pro Glu Gly Ser Phe Phe Ser Val Glu Gly Gly

                    *                           *                           *
GAG ATC CGC GCA CGT GGC GTA GAA ATC GAA GCG AAA CGG CCG CTG TCG GCG AGT GTT
Glu Ile Arg Ala Arg Gly Val Glu Ile Glu Ala Lys Arg Pro Leu Ser Ala Ser Val

                         *                          2300                          *
AAC GTA GTC GGT TCT TAT ACT TAC ACC GAT GCG GAA TAC ACC ACC GAT ACT ACC TAT
Asn Val Val Gly Ser Tyr Thr Tyr Thr Asp Ala Glu Tyr Thr Thr Asp Thr Thr Tyr

                              *                           *
AAA GGC AAT ACG CCT GCA CAG GTG CCA AAA CAC ATG GCT TCG TTG TGG GCT GAC TAC
Lys Gly Asn Thr Pro Ala Gln Val Pro Lys His Met Ala Ser Leu Trp Ala Asp Tyr

 *                           2400                          *
ACC TTC TTT GAC GGT CCG CTT TCA GGT CTG ACG CTG GGC ACC GGT GGT CGT TAT ACT
Thr Phe Phe Asp Gly Pro Leu Ser Gly Leu Thr Leu Gly Thr Gly Gly Arg Tyr Thr

    *                           *                           *
GGC TCC AGT TAT GGT GAT CCG GCT AAC TCC TTT AAA GTG GGA AGT TAT ACG GTC GTG
Gly Ser Ser Tyr Gly Asp Pro Ala Asn Ser Phe Lys Val Gly Ser Tyr Thr Val Val

      2500                          *                           *
GAT GCG TTA GTA CGT TAT GAT CTG GCG CGA GTC GGC ATG GCT GGC TCC AAC GTG GCG
Asp Ala Leu Val Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Met Ala Gly Ser Asn Val Ala

                    *                           *                  PvuII       2600
CTG CAT GTT AAC AAC CTG TTC GAT CGT GAA TAC GTC GCC AGC TGC TTT AAC ACT TAT
Leu His Val Asn Asn Leu Phe Asp Arg Glu Tyr Val Ala Ser Cys Phe Asn Thr Tyr

                         *                           *                           *
GGC TGC TTC TGG GGC GCA GAA CGT CAG GTC GTT GCA ACC GCA ACC TTC CGT TTC TAA
Gly Cys Phe Trp Gly Ala Glu Arg Gln Val Val Ala Thr Ala Thr Phe Arg Phe

                    *                          2700                          *
TTTCTCTTTTGGGGCACGGATTTCCGTGCCCATTTCACAAGTTGGCTGTT  ATG CAG GAA TAC ACG AAT
                                                    fMet Gln Glu Tyr Thr Asn    Fhu

                              *                           *                  SmaI*
CAT TCC GAT ACC ACT TTT GCA CTG CGT AAT ATC TCC TTT CGT GTG CCC GGG CGC ACG
His Ser Asp Thr Thr Phe Ala Leu Arg Asn Ile Ser Phe Arg Val Pro Gly Arg Thr

               2800                          *                           *
CTT TTG CAT CCG CTG TCG TTA ACC TTT CCT GCC GGG AAA GTG ACC GGT CTG ATT GGT
Leu Leu His Pro Leu Ser Leu Thr Phe Pro Ala Gly Lys Val Thr Gly Leu Ile Gly

                         *                           *                          2900
CAC AAC GGT TCT GGT AAA TCC ACT CTG CTC AAA ATG CTT GGC CGT CAT CAG CCG CCG
His Asn Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Lys Met Leu Gly Arg His Gln Pro Pro

                              *                           *
TCG GAA GGG GAG ATT CTT CTT GAT GCC CAA CCG CTG GAA AGC TGG AGC AGC AAA GCG
Ser Glu Gly Glu Ile Leu Leu Asp Ala Gln Pro Leu Glu Ser Trp Ser Ser Lys Ala
```

```
                                                    3000
TTT GCC CGC AAA GTG GCT TAT TTG CCG CAG CAG CTT CCT CCG GCA GAA GGG ATG ACC
Phe Ala Arg Lys Val Ala Tyr Leu Pro Gln Gln Leu Pro Pro Ala Glu Gly Met Thr

GTG CGT GAA CTG GTG GCG ATT GGT CGT TAC CCG TGG CAT GGC GCG CTG GGG CGC TTT
Val Arg Glu Leu Val Ala Ile Gly Arg Tyr Pro Trp His Gly Ala Leu Gly Arg Phe

                    3100
GGC GCG GCA GAT CGC GAA AAA GTC GAG GAA GCT ATC TCG CTG GTT GGC TTA AAA CCG
Gly Ala Ala Asp Arg Glu Lys Val Glu Glu Ala Ile Ser Leu Val Gly Leu Lys Pro

CTG GCG CAT CGG CTG GTC GAT AGT CTC TCT GGC GGC GAA CGT CAG CGG GCG TGG ATC
Leu Ala His Arg Leu Val Asp Ser Leu Ser Gly Gly Glu Arg Gln Arg Ala Trp Ile

          3200                                                      3300
GCC ATG CTG GTG GCG CAG GAT AGC CGT TGT CTG TTG CTC GAC GAA CCG ACC TCG GCG
Ala Met Leu Val Ala Gln Asp Ser Arg Cys Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Ser Ala

CTG GAT ATC GCC CAC CAG GTT GAT GTG CTG TCG CTG GTG CAC CGT TTA AGT CAG GAG
Leu Asp Ile Ala His Gln Val Asp Val Leu Ser Leu Val His Arg Leu Ser Gln Glu

CGT GGC CTG ACG GTC ATT GCC GTG TTG CAC GAT ATC AAT ATG GCG GCA CGC TAC TGT
Arg Gly Leu Thr Val Ile Ala Val Leu His Asp Ile Asn Met Ala Ala Arg Tyr Cys

                                                    3400
GAT TAT CTG GTC GCC CTG CGC GGC GGT GAA ATG ATT GCT CAG GGA ACG CCT GCG GAA
Asp Tyr Leu Val Ala Leu Arg Gly Gly Glu Met Ile Ala Gln Gly Thr Pro Ala Glu

ATT ATG CGC GGC GAA ACC CTC GAA ATG ATT TAT GGC ATC CCG ATG GGT ATT TTG CCG
Ile Met Arg Gly Glu Thr Leu Glu Met Ile Tyr Gly Ile Pro Met Gly Ile Leu Pro

                    3500
CAT CCG GCG GGT GCT GCA CCT GTG AGT TTT GTT TAT   TGATG AGC GGC TTA CCT CTT
His Pro Ala Gly Ala Ala Pro Val Ser Phe Val Tyr      Met Ser Gly Leu Pro Leu    PhuD

          *SalI
ATT TCG CGC CGT CGA CTG TTA ACG GCG ATG GCG CTT TCT CCC TTG TTA TGG CAG ATG
Ile Ser Arg Arg Arg Leu Leu Thr Ala Met Ala Leu Ser Pro Leu Leu Trp Gln Met

          3600                                                      3700
AAT ACC GCC CAC GCG GCG GCT ATT GAT CCC AAT CGT ATT GTG GCG CTG GAG TGG TTG
Asn Thr Ala His Ala Ala Ala Ile Asp Pro Asn Arg Ile Val Ala Leu Glu Trp Leu

CCC GTG GAA GTA CTG CTG GCG CTC GGC ATC GTG CCT TAC GGC GTG GCG GAT ACC ATC
Pro Val Glu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Pro Tyr Gly Val Ala Asp Thr Ile

AAC TAT CGC CTG TGG GTC AGC GAA CCA CCA TTG CCG GAC TCA GTG ATC GAC GTC GGT
Asn Tyr Arg Leu Trp Val Ser Glu Pro Pro Leu Pro Asp Ser Val Ile Asp Val Gly

                                                    3800
TTG CGC ACA GAA CCT AAC CTT GAA CTG CTG ACC GAA ATG AAA CCA TCG TTT ATG GTC
Leu Arg Thr Glu Pro Asn Leu Glu Leu Leu Thr Glu Met Lys Pro Ser Phe Met Val

TGG TCG GCA GGA TAT GGC CCT TCA CCA GAA ATG CTG GCT CGT ATT GCG CCG GGT CGC
Trp Ser Ala Gly Tyr Gly Pro Ser Pro Glu Met Leu Ala Arg Ile Ala Pro Gly Arg
```

```
                                    3900
GGA TTT AAC TTC AGT GAC GGC AAA CAG CCG TTG GCG ATG GCG CGT AAA TCG CTG ACG
Gly Phe Asn Phe Ser Asp Gly Lys Gln Pro Leu Ala Met Ala Arg Lys Ser Leu Thr

GAA ATG GCA GAT TTA CTT AAC CTG CAA AGC GCA GCG GAA ACG CAT TTA GCG CAA TAT
Glu Met Ala Asp Leu Leu Asn Leu Gln Ser Ala Ala Glu Thr His Leu Ala Gln Tyr

          4000
GAA GAC TTT ATC CGC AGC ATG AAA CCC CGC TTT GTG AAG CGT GGT GCG CGT CCG TTA
Glu Asp Phe Ile Arg Ser Met Lys Pro Arg Phe Val Lys Arg Gly Ala Arg Pro Leu

TTG CTG ACG ACG CTT ATC GAT CCG CGC CAT ATG CTG GTC TTC GGT CCA AAC AGC TTG
Leu Leu Thr Thr Leu Ile Asp Pro Arg His Met Leu Val Phe Gly Pro Asn Ser Leu

00
TTC CAG GAA ATT CTT GAT GAG TAC GGC ATC CCA AAT GCC TGG CAA GGG GAA ACC AAC
Phe Gln Glu Ile Leu Asp Glu Tyr Gly Ile Pro Asn Ala Trp Gln Gly Glu Thr Asn

                                        4200
TTC TGG GGC AGT ACC GCC GTC AGT ATC GAT CGT CTG GCG GCG TAT AAA GAC GTT GAT
Phe Trp Gly Ser Thr Ala Val Ser Ile Asp Arg Leu Ala Ala Tyr Lys Asp Val Asp

GTG CTC TGT TTT GAT CAC GAC AAC AGC AAA GAC ATG GAT GCG CTA ATG GCA ACG CCG
Val Leu Cys Phe Asp His Asp Asn Ser Lys Asp Met Asp Ala Leu Met Ala Thr Pro

                                4300                          *PstI
CTG TGG CAG GCC ATG CCG TTT GTC CGC GCC GGA CGC TTT CAG CGC GTA CCT GCA GTC
Leu Trp Gln Ala Met Pro Phe Val Arg Ala Gly Arg Phe Gln Arg Val Pro Ala Val

TGG TTT TAT GGT GCG ACG CTC TCG GCA ATG CAC TTT GTG CGC GTT CTG GAT AAC GCC
Trp Phe Tyr Gly Ala Thr Leu Ser Ala Met His Phe Val Arg Val Leu Asp Asn Ala

          4400
ATC GGA GGT AAA GCG TGA  GT AAA CGA ATT GCG CTT TTC CCG GCG GTA TTG CTG GCG
Ile Gly Gly Lys Ala
               fMet  Ser  Lys Arg Ile Ala Leu Phe Pro Ala Leu Leu Leu Ala    FhuB
```

Abb. 2 : Nukleotidsequenz der fhuACD Region und abgeleitete Aminosäuresequenzen für die größten offenen Leseraster. Die Sequenz ab bp4320 (PstI Schnittstelle) wurde (78) entnommen. Ribosomenbindestellen für fhuA und fhuC sind unterstrichen. Das zweite mögliche Startcodon für fhuD ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Ribosomenbindestellen für beide Starts sind überstrichen.

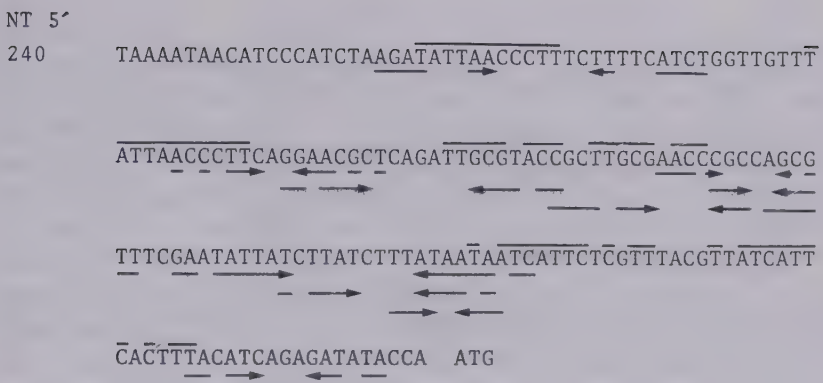


Abb. 3 : Sekundärstrukturen und Sequenzhomologien der fhuA Promotorregion. Palindrome sind durch Pfeile gekennzeichnet. Homologe Sequenzen sind überstrichen.

Gen	Position	Sequenz
fhuA	364	TTTATAATAATCATTCTCGTTTACGTTATC
fhuC	2657	TTTCTAATTTCTCTTTTGGGGCACGGATTT
fhuB	4357	CACTTTGTGCGCGGTTCTGGATAACGCGATC
fhuA	404	CATCAGAGATATACCA ATG
fhuC	2696	TTTCACAAGTTGGCTGTT ATG
fhuB	4383	CATCGGAGGTAAAGC GTG

Abb. 4 : Sequenzhomologien im Promotorbereich von fhuA, fhuC und fhuB. Identische Sequenzen sind umrandet. Die Position ist nach Abb. 2 angegeben. Die fhuB Sequenz wurde (78) entnommen.

3.2. Aminosäuresequenz von FhuA

FhuA setzt sich aus 747 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 82202 Dalton zusammen. Die Aminosäuren 1 - 33 zeigen Signalsequenzcharakter (62). Die tatsächliche Länge der Signalsequenz und die Schnittstelle wurden durch Ermitteln der 12 N-terminalen Aminosäuren des reifen Proteins bestimmt (70). Reifes FhuA hat demnach 714 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 78992 Dalton. Dieser Wert stimmt mit dem in der SDS Page ermittelten Molekulargewicht von 78kD überein. Das Protein setzt sich zusammen aus 9% positiv und 12% negativ geladenen Aminosäuren und hat eine Nettogesamtladung von -16. Dieser Wert ist vergleichbar mit anderen Proteinen der äußeren Membran wie FepA, BtuB und Iut (85). Die Aminosäurezusammensetzung ist in Abb.5 dargestellt.
Der Codongebrauch entspricht dem stark exprimierter Gene (52) und ist in Abb.6 wiedergegeben.
Abb. 7 zeigt das über 9 Aminosäuren gemittelte Hydrophobizitätsprofil von FhuA, das nach Kyte und Doolittle erstellt wurde (80). Hydrophobe Bereiche befinden sich oberhalb der Nullinie. Nur der N-terminale Bereich (Signalsequenz) und der C-terminale Abschnitt des Proteins besitzen stärker hydrophoben Charakter, während die anderen Teile eher hydrophiler Natur sind.
Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von FhuA mit den tonB abhängigen Rezeptorproteinen Iut (79), FhuE (111), BtuB (64) und FepA (85), sowie mit ColM (77) und ColB (90) zeigte eine Homologie im aminoterminalen Bereich, die als "tonB Box" bezeichnet wurde (Abb.8). Zwei weitere aminoterminale und ein im Carboxyterminus gelegener Homologiebereich zwischen FhuA, BtuB, Iut und FepA wurden ebenfalls festgestellt (85).

Ala(A)	67(7)	Glu(E)	35	Leu(L)	46(1)	Ser(S)	54(4)
Arg(R)	34(2)	Gln(Q)	33(2)	Lys(K)	40(3)	Thr(T)	59(3)
Asn(N)	42	Gly(G)	62(1)	Met(M)	12(2)	Trp(W)	9
Asp(D)	50	His(H)	8(1)	Phe(F)	36	Tyr(Y)	42(1)
Cys(C)	4	Ile(I)	17(1)	Pro(P)	38(1)	Val(V)	59(4)

Abb.5: Aminosäurezusammensetzung von FhuA. Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den Aminosäuren der Signalsequenz.

Phe	TTT	18	(50/44)	Ser	TCT	14(1)	(26/27)	Tyr	TAT	23(1)	(55/41)
	TTC	18	(50/56)		TCC	10(1)	(19/26)		TAC	19	(45/59)
Leu	TTA	2	(4/ 6)		TCA	3(1)	(6/ 8)	*	TAA	1	
	TTG	6	(13/ 8)		TCG	8	(15/11)	*	TAG	0	
Leu	CTT	6	(13/ 9)	Pro	CCT	8	(21/ 9)	His	CAT	3	(38/39)
	CTC	2	(4/ 7)		CCC	0	(0/ 6)		CAC	5(1)	(62/61)
	CTA	1	(2/ 2)		CCA	5(1)	(13/20)	Gln	CAA	8	(24/27)
	CTG	29(1)	(63/69)		CCG	25	(66/65)		CAG	25(2)	(76/73)
Ile	ATT	10	(59/37)	Thr	ACT	14(1)	(24/24)	Asn	AAT	18	(43/24)
	ATC	7(1)	(41/62)		ACC	35	(56/51)		AAC	24	(57/76)
	ATA	0	(0/ 1)		ACA	4(2)	(7/ 6)	Lys	AAA	30(3)	(75/77)
Met	ATG	12(2)			ACG	8	(14/20)		AAG	10	(25/23)
Val	GTT	24(3)	(41/38)	Ala	GCT	12(1)	(18/28)	Asp	GAT	30	(60/51)
	GTC	14	(24/13)		GCC	11(1)	(16/19)		GAC	20	(40/49)
	GTA	8(1)	(14/23)		GCA	19(3)	(28/23)	Glu	GAA	26	(74/73)
	GTG	13	(22/27)		GCG	25(2)	(37/30)		GAG	9	(26/27)

Cys	TGT	1	(25/42)	Arg	CGT	24(2)	(71/58)
	TGC	3	(75/58)		CGC	7	(20/35)
*	TGA	0			CGA	2	(6/ 2)
Trp	TGG	9			CGG	1	(3/ 3)
Ser	AGT	4	(7/ 6)				
	AGC	15(1)	(28/22)	Arg	AGA	0	(0/ 1)
					AGG	0	(0/03)
Gly	GGT	27	(44/48)				
	GGC	28(1)	(45/41)				
	GGA	2	(3/ 5)				
	GGG	5	(8/ 7)				

Abb.6: Codongebrauch des fhuA Gens. Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den Codons der Signalsequenz. Die Zahlenpaare (x/y) geben den Gebrauch der synonymen Codons für fhuA (x) und für nicht regulatorische Gene von E.coli (y) an und errechnen sich aus der Anzahl des benützten Codons geteilt durch die Anzahl aller möglichen Codons derselben Aminosäure in Prozent ausgedrückt (77a).

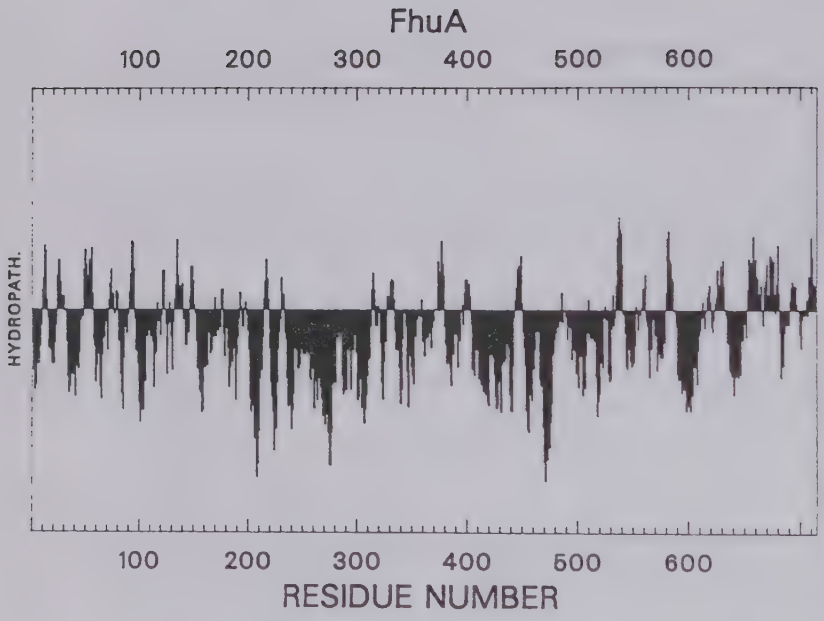


Abb. 7 : Hydrophobizitätsprofil des FhuA Proteins nach Kyte und Doolittle (80).

FhuA	(1-17)	A V E P D E D T I T V T A A P A P
Iut	(1-16)	Q Q T D D E T F V V S A N R S N
FepA	(1-22)	Q E P T D T P V S H D D T I V V T A A E Q N
FhuE	(1-16)	A P A T E E T V I V E G S A T A
BtuB	(1-16)	Q D T S P D T L V V T A N R F E
ColM	(1-12)	M E T L T V H A P S P S

Abb.8 : Homologe Sequenzen im aminoterminalen Bereich der Membranproteine FhuA, Iut, FepA, FhuE und BtuB sowie des ebenfalls TonB abhängigen ColM Proteins (85 ,111 , 77 , 90). Die unterstrichenen Aminosäuren entsprechen der vorgeschlagenen "TonB Box".

3.3. Versuche zur Eingrenzung des Promotorbereichs und der Fur Bindestelle des fhuA Gens

Lundrigan und Kadner (85) fanden am 5'Ende der eisenregulierten äußeren Membranproteine FepA, Iut, FhuA und BtuB eine Konsensussequenz, der sie die Funktion einer Fur Bindestelle (55) zuschrieben. Im Falle von FhuA läge diese Stelle außerhalb des postulierten Promotorbereichs bei Nukleotid 314 - 322 (Abb.2).
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Plasmid pRb123 und seine Derivate konstruiert.
Das 5,6kb PstI/PstI Fragment aus Abbildung 10 wurde in pUC19 in gegenläufiger Orientierung zum lac Promotor kloniert. Daraus resultiert Plasmid pRB123. Eine Transkription und Expression der Gene findet nur dann statt, wenn ein eigener Promotor vorgeschaltet liegt. Plasmid pRB124 trägt dasselbe Fragment wie pRB123 in pUC19 so inseriert, daß vom lac Promotor aus transkribiert werden kann. Um die fragliche Fur Bindestelle zu entfernen, wurde das Plasmid pRB123 mit BamHI im Polylinker von pUC19 und mit AsuII in der fhuA Region geschnitten. Die Enden wurden aufgefüllt und ligiert. Das entstandene Plasmid pRB17 war bis bp347 (Abb.2) vom 5'Ende der Insertion verkürzt. Die Plasmide pRB123, pRB17 und pRB124 wurden in LF941(fhuA) transformiert und auf Wachstum mit Ferrichrom und T5 Sensitivität getestet. Sowohl LF941(pRB123) als auch LF941(pRB17) und LF941(pRB124) konnten wieder Ferrichrom verwerten und waren empfindlich gegen T5 Phagen; fhuA wurde exprimiert.
Um zu prüfen, ob die Gene noch eisenreguliert sind, wurden die Zellen in TY Medium und unter Eisenmangel angezogen. Die äußere Membran wurde nach 2.2.8. präpariert. Die SDS Gelelektrophorese zeigte, daß FhuA unabhängig von den Anzuchtbedingungen in den drei Stämmen überexprimiert wurde. In einem zweiten Ansatz wurden die Stämme mit dem fur Plasmid pMH15 (112) transformiert um eine Dereprimierung der Gene aufgrund zu geringer Mengen an Repressorprotein auszuschließen. Die SDS PAGE der äußeren Membranproteine zeigte jedoch wieder eine Überexpression des FhuA Proteins bei guter und schlechter Eisenversorgung der Stämme LF941(pRB123,pMH15), LF941(pRB17,pMH15) und LF941(pRB124,pMH15)

(Abb.9). Im Kontrollstamm LF941(FB103/I,pMH15), der die fhuA Region im Plasmid pBR322 trägt, ist fhuA noch eisenreguliert. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Promotorbereich von fhuA im verkürzten Plasmid pRB17 erhalten geblieben ist. Das Testsystem ist jedoch aufgrund der hohen Kopienzahl, in der die pUC Abkömmlinge pRB123, pRB17 und pRB124 in der Zelle vorliegen, nicht für Regulationsstudien geeignet.

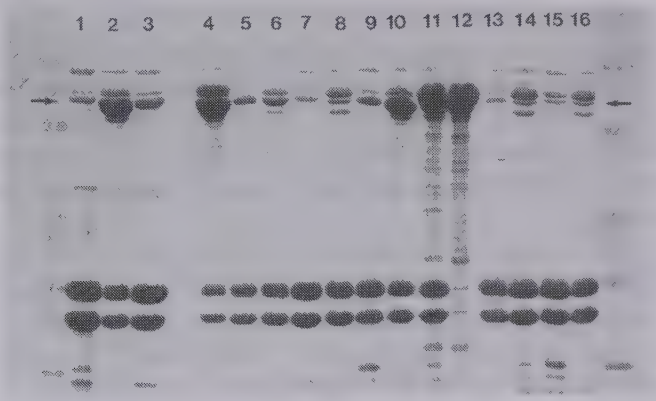


Abb.9: Proteinmuster deräußeren Membran von E.coli nach Auftrennung in der SDS PAGE. Die Zellen wurden in Parallelansätzen mit Eisen und unter Eisenmangel gezüchtet. Die Membranen wurden aus jeweils zwei Klonen, die dasselbe Plasmid tragen, isoliert. FhuA Protein wird durch einen Pfeil markiert. Die Reihenfolge der aufgetragenen Proben lautet: 1,9, LF941(FB103/I,pMH15), 2,10, LF941(FB103/I,pMH15) mit Dipyridyl, 3,11, LF941(pRB124,pMH15), 4,12, LF941(pRB124,pMH15) mit Dipyridyl, 5,13, LF941 (pRB123,pMH15), 6,14, LF941(pRB123,pMH15) mit Dipyridyl, 7,15, LF941(pRB17,pMH15), 8,16, LF941 (pRB17,pMH15) mit Dipyridyl.

3.4. Klonierung und Komplementation des fhuC Locus

Als Ausgangsplasmid diente pPF3/V1 (39), das die gesamte fhu Region auf einem 7,8kb Fragment in der PstI Stelle des Ampicillin Resistenzgens von pBR322 trägt.
Die fhuC Region wurde auf einem 1,9kb großen SalI Teilfragment lokalisiert. Um Genanfang und Transkriptionsrichtung näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Bereiche nach Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen in die Vektoren pUC18 und pUC19 kloniert (125).
Die Selektion erfolgte nach Transformation in den Stamm JM101 auf TY Platten mit Ampicillin und IPTG/X-Gal. Rekombinante Plasmide wurden in LF947(fhuC) (39) transformiert und auf Wachstum auf Eisenmangelplatten mit Ferrichrom und auf Albomycinsensitivität getestet. Die Plasmide sind in Abbildung 10 dargestellt.
LF947(pRB120) und LF947(pRB230) ließen sich wie der Kontrollstamm LF947(pPF3/V1) zum Wachstum mit Ferrichrom komplementieren. LF947(pRB32), der dasselbe Insert wie LF947(pRB230) in der umgekehrten Orientierung enthält, wird ebenfalls komplementiert. Der Wachstumshof ist jedoch wesentlich kleiner und weniger dicht als der des Kontrollstammes. Das auf 0,9kb verkürzte SmaI/SalI Fragment in pRB20 (Abb.10) ist nicht mehr zur Komplementation fähig. Da dieses Insert in pUC18 im Leseraster der ß Galaktosidase des Vektors kloniert wurde und der Funktionsausfall von fhuC auf einem Fusionsprotein aus Enzym und FhuC beruhen könnte, bei dem die ersten 21 N-terminalen Aminosäuren von FhuC gegen die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren der ß Galaktosidase ausgetauscht sind, wurde pRB200 konstruiert. Durch EcoRI Verdau im Polylinker von pRB20, auffüllen der überhängenden Enden und anschließender Ligation entstand vor der SmaI Stelle des Inserts ein Translationsstop für die ß Galaktosidase. Jedoch konnte dieses Plasmid ebenso wie die C-terminal verkürzten Plasmide pRB12 und pRB21 das Eisenaufnahmesystem für Ferrichrom in der fhuC Mutante LF947 nicht wieder herstellen.

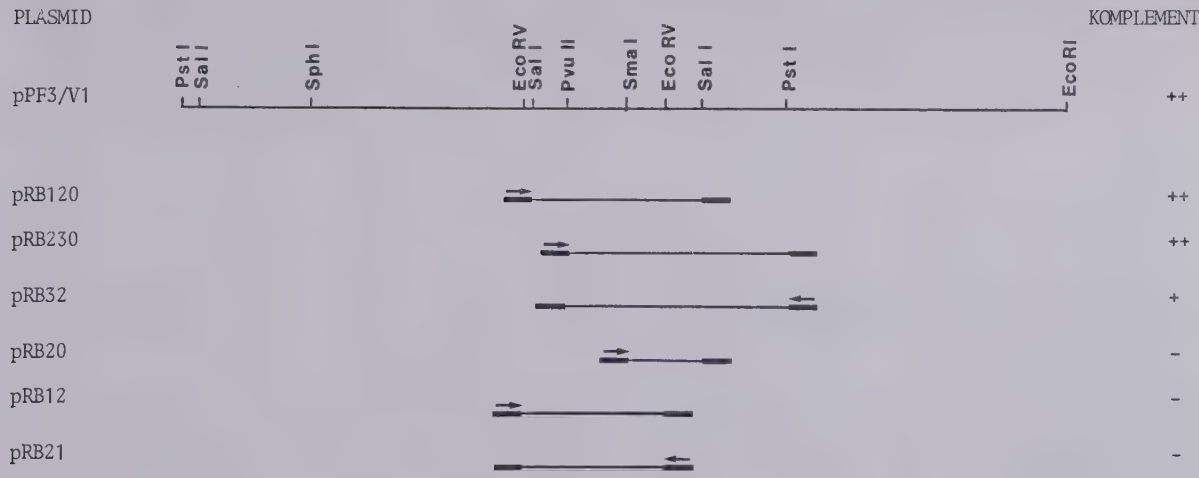


Abb.10: Komplementation der Mutante LF947(fhuC). Die isolierten DNA Fragmente (dünne Linien) wurden in pUC18 oder pUC19 kloniert. Die Transkriptionsrichtung der Klone ist durch Pfeile markiert.

3.5. Nukleotidsequenz der fhuC Region

Das von Fecker und Braun (39) beschriebene fhuC Genprodukt mit einer Größe von 30K benötigt zur Kodierung etwa 820bp und ist vollständig auf dem 950bp großen PvuII/SalI Fragment vorhanden (Abb.11). Die Restriktionsendonukleasen HpaII, HaeIII, Sau3A, TaqI und EcoRV wurden zur Subklonierung in die Phagen M13mp18 und mp19 (91) verwendet. Einzelstrang DNA wurde nach der Dideoxymethode von Sanger sequenziert (110).
Sequenzstrategie und Nukleotidsequenz sind in Abb.11 und Abb.2 dargestellt.
Für das 500bp große PvuII/Sau3A Fragment (Abb.11) wurde nach Erstellen einer Teilsequenz ein 18bp Primer mit der Sequenz 5'TTTCCCGGCAGGAAAGGT 3' synthetisiert. Damit konnte dieser Klon ab bp 2809 (Abb.2) in gegenläufiger Orientierung vollständig über die SmaI Schnittstelle hinweg gelesen werden.
Ab bp 2714 (Abb. 2) beginnt ein großes offenes Leseraster mit einer Länge von 795bp und ATG als Startcodon, das in ein Palindrom eingebettet ist (Abb.12). Im Abstand von 6bp konnte eine dazugehörende Ribosomenbindestelle ACAAGTTG gefunden werden, die teilweise komplementär zur 16S rRNA Sequenz AUUCCUCCACU ist (116). Auch Promotorstrukturen waren nach der Konsensussequenz von Rosenberg und Court vorhanden (108). Eine -10 Region TCTAATTT beginnt mit dem Stopcodon von fhuA (Abb.2). 17bp stromaufwärts liegt eine mögliche -35 Region TTGCAA im fhuA Gen.
Auch die Komplementationsdaten, die einen Beginn des Gens vor der SmaI Schnittstelle nahelegen, sprechen zumindest für einen schwachen Promotor vor fhuC.
Ein weiteres offenes Leseraster auf demselben Strang existiert im Bereich von fhuA/ fhuC (153bp).
Der kodierende Bereich endet mit zwei aufeinanderfolgenden Stopcodons TGATGA, denen im Abstand von 20bp eine Palindromstruktur folgt (Abb.12). Daran anschließend finden sich jedoch weder Strukturen für eine rho abhängige noch für eine rho unabhängige Termination der Transkription (95 ,108).
Trotz zahlreicher Palindrome lassen sich keine Homologien zu mRNA stabilisierenden REP Sequenzen finden.

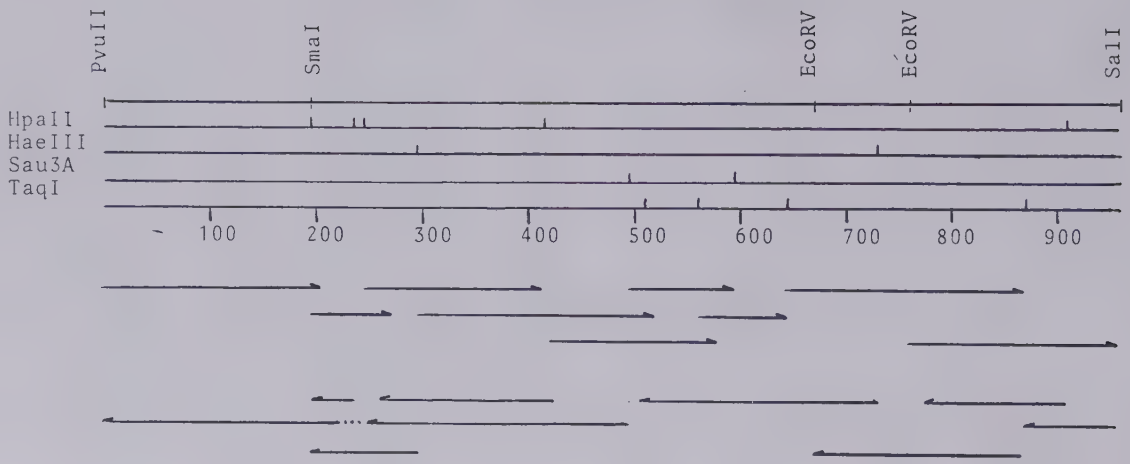


Abb.11 Sequenzstrategie der fhuC Genregion. Länge und Richtung der sequenzierten Klone werden durch die Pfeile angegeben.

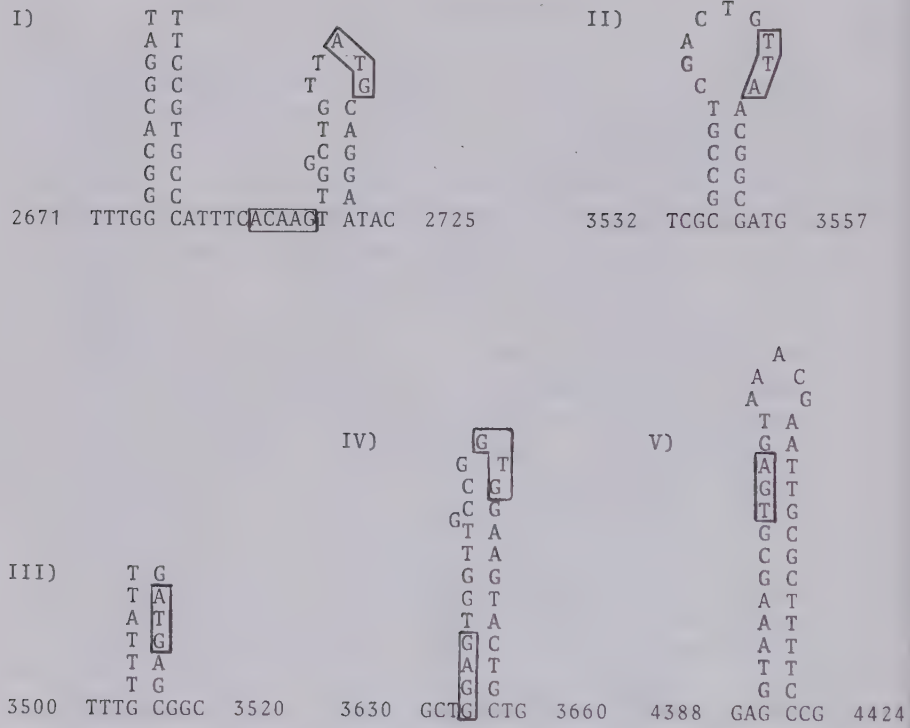


Abb. 12 : Mögliche Sekundärstrukturen im Bereich der Termination von fhuA, des Beginns von fhuC(I), des Translationsstops von fhuC(II), der möglichen Startcodons 1 (III) und 5(IV) von fhuD und des Translationsstops von fhuD(V).
Ribosomenbindestellen, Start- und Stopcodons sind umrandet

3.6. Aminosäuresequenz von FhuC

FhuC wird von 265 Aminosäuren gebildet und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 29 255 D. Im Polyacrylamid Gelsystem wurde ein Wert von 30K bestimmt (39).
Das Protein besteht zu 50,8% aus unpolaren Aminosäureresten, 31% sind ungeladen polar, 9,4% sind positiv und 9,6% sind negativ geladen. Dies entspricht einer Nettoladung von -1.
Aminosäurezusammensetzung und Codonauswahl sind in Abb.14 und Abb.15 wiedergegeben.
Der Codongebrauch entspricht eher dem schwach exprimierter Gene (52).
Das Hydrophobizitätsprofil, das nach Kyte und Doolittle (80) über neun Aminosäuren gemittelt wurde, ist in Abb.16 gezeigt. Im carboxyterminalen Teil des Proteins befinden sich längere hydrophobe Bereiche, die wahrscheinlich membranassoziiert sind, während der Aminoterminus größtenteils hydrophilen Charakter besitzt.
FhuC kann aus Maxizellen mit der Cytoplasmamembran isoliert werden (39). Das Protein läßt keine aminoterminale Signalsequenz erkennen.
Vergleiche von FhuC mit verschiedenen peripheren Membrankomponenten wie HisP (49,66), MalK (50), PstB (121), BtuD (42) und OppD (68) zeigten zwei ausgedehnte Homologiebereiche von 50% und 64% (Abb.13), die wahrscheinlich für die Bindung von ATP verantwortlich sind (2,68). Diese Konsensussequenzen wurden ebenfalls in anderen ATP bindenden Proteinen verschiedenster Funktionen und Herkunft wie HlyB (40), NodI (38), FtsE (48), UvrA,B (33), sowie in eu- und prokaryontischen ATPasen und ATP abhängigen Enzymen nachgewiesen (69,127).
Ein Vergleich der Primärstrukturen der Komponenten FhuA, FhuD (3.8.) und FhuB (78) des Ferrichromtransportsystems lieferte folgende Ergebnisse:
FhuC hat eine Region von 22 Aminosäuren, welche 39% Homologie zu zwei verschiedenen FhuA Bereichen im carboxyterminalen Teil des Proteins zeigt (Abb.13) und zwischen den beiden nukleotidbindenden Stellen liegt (Abb.17).

Auch zu FhuD und zu FhuB ließen sich Bereiche finden, die sehr ähnlich sind (Abb.13). 15 Aminosäurereste mit 40% Homologie zu FhuD liegen im Carboxyterminus von FhuC. Eine weitere Homologie zu FhuB von 50% findet sich um den Bereich der ersten Nukleotidbindestelle von FhuC (Abb.13, Abb.17).

FhuA	653	G S Y T V V D A L V R Y D L R - R V	39%
FhuC	104	L V A I - G R Y P W N G A L G R P G A A D R E	
FhuA	445	L V T L G G R Y D W - - - - - - - - - - A D Q E	39%
FhuA	165	L L N M V S K R P T T E P L K E V Q F	37%
FhuD	145	L L N L Q S A A E T H L A Q Y E D - F	
FhuA	576	P L S A S V N V V G S Y T Y T D A E Y T T	43%
FhuD	56	P L P D S V I D V G L R T E P N L E L L T	
FhuC	198	L T V I A V L H D I N M A A R	40%
FhuD	121	L T E M A D L L N L Q S A A E	
FhuC	40	G L I G H N G S G K S T L L K M L G	50%
FhuB	216	G I I G F I G L F A P L L A K M L G	
FhuD	156	G A R P L L L T T L I D P R S I	50%
FhuB	405	G A - P L L L W L L P R L R F V	

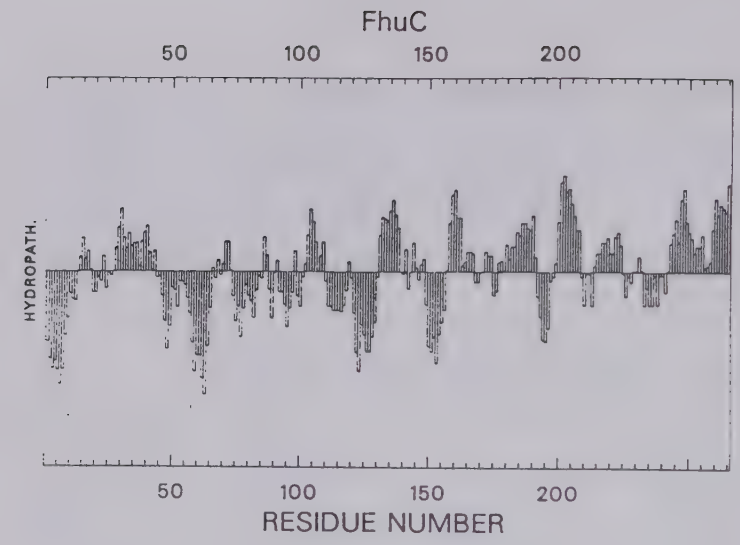
Abb.13: Aminosäurehomologien zwischen FhuA, FhuC, FhuD und FhuB. Die Zahlen geben die Position der Aminosäure vom NH_2-Terminus an. Identische Aminosäuren sind mit " * " gekennzeichnet.

Ala(A) 27	Glu(E) 16	Leu(L) 35	Ser(S) 17
Arg(R) 18	Gln(Q) 10	Lys(K) 7	Thr(T) 12
Asn(N) 4	Gly(G) 24	Met(M) 9	Trp(W) 3
Asp(D) 10	His(H) 10	Phe(F) 6	Tyr(Y) 7
Cys(C) 2	Ile(I) 14	Pro(P) 17	Val(V) 17

Abb.14: Aminosäurezusammensetzung von FhuC.

Phe TTT 6	Ser TCT 2	Tyr TAT 4	Cys TGT 2
TTC 0	TCC 3	TAC 3	TGC 0
Leu TTA 3	TCA 0	* TAA 0	* TGA 1
TTG 5	TCG 5	* TAG 0	Trp TGG 3
Leu CTT 5	Pro CCT 4	His CAT 6	Arg CGT 9
CTC 4	CCC 1	CAC 4	CGC 7
CTA 0	CCA 0	Gln CAA 1	CGA 0
CTG 18	CCG 12	CAG 9	CGG 2
Ile ATT 8	Thr ACT 2	Asn AAT 3	Ser AGT 3
ATC 6	ACC 6	AAC 1	AGC 4
ATA 0	ACA 0	Lys AAA 7	Arg AGA 0
Met ATG 9	ACG 4	AAG 0	AGG 0
Val GTT 3	Ala GCT 4	Asp GAT 9	Gly GGT 8
GTC 4	GCC 7	GAC 1	GGC 9
GTA 0	GCA 5	Glu GAA 13	GGA 1
GTG 10	GCG 11	GAG 3	GGG 6

Abb.15 : Codongebrauch des fhuC Gens.



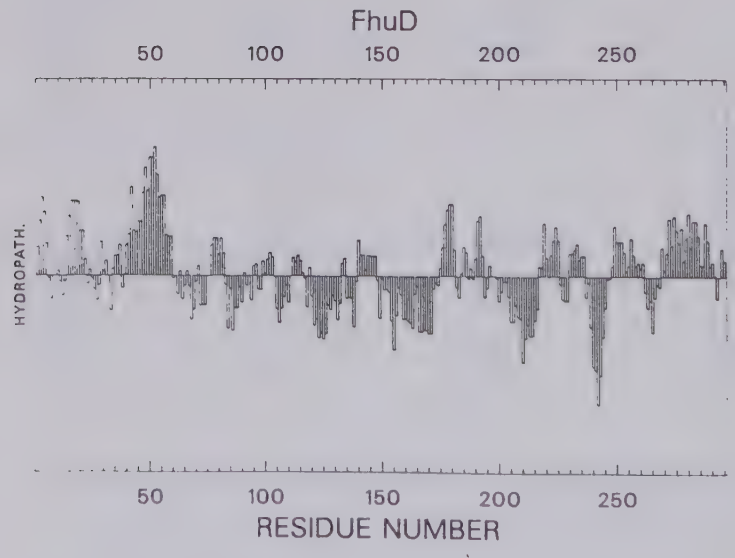


Abb.16: Hydrophobizitätsprofile der Proteine FhuC und FhuD nach Kyte und Doolittle

PROTEIN		POSITION	SEQUENZ
FhuC		30	LSLTFPAGKVTGLIGHNGSGKSTL-LKMLGRH
BtuD		19	LSGEVRAGEILHLVGPNGAGKSTL-LARMAGM
HisP		25	VSLQARAGDVISIIGSSGSGKSTF-LRCINFL
MalK		22	INLDIHEGEFVVFVGPSGCGKSTL-LRMIAGL
PstB		29	INLDIAKNQVTAFIGPSGCGKSTL-LRTFNKM
OppD1	(Ec)	43	VTLRLYEGETLGVVGESGCGKSTF-ARAIIGL
OppD2	(Ec)	42	LNFSLRAGRTLGIVGESGSGKSQT-AFALMGL
OppD	(St)	40	LNFTLRAGETLGIVGESGSGKSQSRLR-LMGL
RbsA	(N)	23	AALNVYPGRVMALVGENGAGKSTM-MKVLTGI
FhuC		141	LSGGERQRAWIAM-LVAQDSR------CLLLDEPTSALDIAHQVDVLSLVHR
BtuD		127	LSGGEWQRVRLAAVVLQITPQANPAGQLLLLDEPMNSLDVAQQSALDKILSA
HisP		154	LSGGQQQRVSIARAL-AMEPD------VLLFDEPTSALDPELVGEVLRIMQQ
MalK		134	LSGGQRQRVAIGRTLVA-EPS------VFLLDEPLSNLDAALRVQMRIEISR
PstB		152	LSGGQQQRLCIARGI-AIRPE------VLLLDEPCSALDPISTGRIEELITE
OppD1	(Ec)	165	FSGGQCQRIGIARAL-ILEPK------LIICDEPVSALDVSIQAQVVNLLQQ
OppD2	(Ec)	169	FSGGMRQRVMIAMALL-CRPK------LLIADEPTTALDVTVQAQIMTLLNE
OppD	(St)	167	FSGGMRQRVMIAMALL-CRPK------LLIADEPTTALDVTVQAQIMTLLNE
RbsA	(N)	144	LSIGDQQMVEIAKVLSF-ESK------VIIMDEPTDALTDTETESLFRVIRE

Abb.17: Homologe Sequenzen der peripheren Membrankomponenten von Bindeprotein abhängigen Transportsystemen. Die Vergleiche von HisP (Histidin), MalK (Maltose), PstB (Phosphat), OppD (Cligopeptid; St: Salmonella typhimurium) und RbsA (Ribose) wurden aus (2) übernommen. BtuD (Vitamin B12) und OppD1, OppD2 (Oligopeptid; Ec: Escherichia coli) sind in (42) und (68) beschrieben. Die überstrichenen konservierten Bereiche sind homolog zu entsprechenden Stellen der ß Untereinheit der ATPase (68,127).

3.7. Nukleotidsequenz der fhuD Genregion

Aus früheren Komplementationsstudien war bekannt, daß fhuD im 800bp großen SalI/PstI Fragment lokalisiert sein sollte (39). Die Subklonierung erfolgte durch Spaltung des isolierten Fragments mit den Restriktionsendonukleasen Sau3A, HpaII, TaqI und RsaI und Ligation der Teilstücke in die M13 Phagen mp18 und mp19. Das EcoRV/PstI Fragment, das die SalI Stelle zwischen fhuC und fhuD enthält, wurde aus dem Plasmid pPF3/V1 (39) isoliert und dazu verwendet, mit Hilfe eines synthetisierten Primers der Sequenz 5'AAATGATTTATGGCATCC 3' ab bp3455 (Abb.2) die Verbindung der beiden Teilsequenzen herzustellen. Die Sequenz ab Position 4320 (PstI Schnittstelle) bis zum Stopcodon von fhuD wurde (78) entnommen. Die sequenzierten DNS Fragmente sind in Abb.18 gezeigt. Die Nukleotidsequenz ist in Abb.2 dargestellt.

Das größtmögliche offene Leseraster für FhuD beginnt bei Position 3511 (Abb.2) vor der SalI Schnittstelle mit dem Startcodon ATG im Stopcodon TGATG von fhuC. Im selben Leseraster folgen nacheinander noch sechs weitere Startcodons bei bp3556, bp3583, bp3625, bp3646, bp3673 und bp3742, die mit ATG oder GTG beginnen. Dem ersten, fünften und siebten Triplett konnte jeweils eine Shine Dalgarno Sequenz zugeordnet werden. Der optimale Abstand zwischen Ribosomenbindestelle und Startcodon wird mit 6 - 9 bp angegeben. Das erste ATG liegt jedoch 12bp von der Ribosomenbindestelle GAG entfernt. Das fünfte Startcodon beginnt mit GTG und hat im Abstand von 9bp die beste Homologie (GGAG) zur Konsensussequenz, während für das siebte Startcodon eine Entfernung von nur 4bp zu klein ist.

Eine starke Genexpression wird nicht in erster Linie durch ATG als Startcodon gewährleistet (81). Eine entscheidendere Rolle spielen lokale Sekundärstrukturen für die Initiation der Translation. Liegen ATG oder GTG in der Schleife einer "stem and loop" Struktur, scheint eine optimale Genexpression gewährleistet zu sein (47, 81). Für alle Startcodons von FhuD konnten Sekundärstrukturen gefunden werden (Abb.12).

Promotorstrukturen sind vor allen Starts nicht vorhanden.

Die kodierende Sequenz endet bei bp4399 mit dem Stopcodon (G)TGA,

das mit dem Startcodon von fhuB überlappt und ebenfalls in eine Palindromstruktur (Abb.12) eingebettet ist (78). mRNA stabilisierende REP Strukturen sind auch hier nur schwach ausgeprägt.

Tab.2 : Sequenzen der Ribosomenbindestelle vor möglichen Startcodons von fhuD.
Zu jedem Startcodon ist das Molekulargewicht des zugehörigen Proteins in Dalton, die Anzahl der benötigten Aminosäuren (AS) und Basenpaare (bp) angegeben.

Sequenz		MW	AS	bp
5'GAGTTTTGTTTATTG	ATG 3'	33.204	296	888
CGACTGTTAACGGCG	ATG	31.472	281	843
CCGTTGTTATGGCAG	ATG	30.482	272	816
GATCCCAATCGTATT	GTG	28.942	258	774
CTGGAGTGGTGGCCG	GTG	28.282	251	753
CTGGCGCTCGGCATC	GTG	27.182	242	726
CCATTGCCGGACTCA	GTG	24.650	219	657

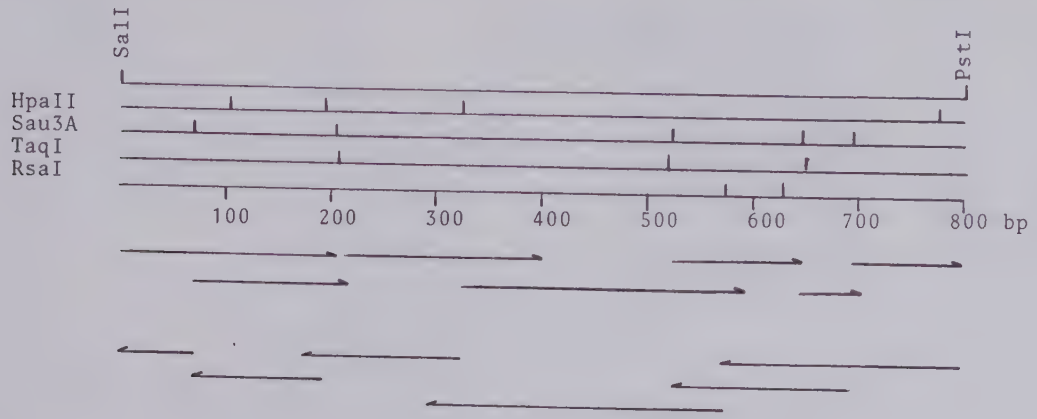


Abb.18 Sequenzierungsstrategie der fhuD Region. Die Pfeile geben die Richtung und die Länge der ermittelten Sequenz an

3.8. Aminosäuresequenz des FhuD Proteins

Das längste offene Leseraster von fhuD kodiert ein Protein von 296 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33204 D. Der Aminoterminus zeigt eine für Signalsequenzen typische Anordnung von Aminosäuren (62): auf drei positiv geladene Argininreste (AS 9-11) folgen 16 hydrophobe Aminosäuren. Daran schließt sich eine mögliche Erkennungsstelle Ala-His-Ala-Ala-Ala für die Signalpeptidase an. Das Molekulargewicht des reifen Proteins ist jedoch mit 31500 D noch viel größer als der von Fecker und Braun (39) nach der SDS PAGE bestimmte Wert von 26000 D.
Ein Beginn des Proteins bei Startcodon 5 ergibt ein Produkt ohne Signalsequenz mit einem Molekulargewicht von 28282 D. In beiden Fällen sind 9% der Aminosäuren positiv und 11% negativ geladen. Die Nettoladung beträgt -5.
Die entsprechenden Proteine der Startcodons 2, 3 und 4 hätten die Molekulargewichte 31472 D, 30482 D und 28942 D. Aufgrund fehlender Ribosomenbindestellen scheint ein Beginn der Translation jedoch unwahrscheinlich.
Aminosäurezusammensetzung und Codongebrauch sind in Abb.19 und Abb.20 dargestellt.
Das Hydrophobizitätsprofil nach Kyte und Doolittle (80) (Abb.16) zeigt ein Protein, das am Aminoterminus (bis AS 50) und am carboxyterminalen Ende (ab AS 250) ausgeprägte hydrophobe Bereiche aufweist und mit diesen in der Membran verankert sein kann.
Vergleiche von FhuD mit den am Ferrichrom Transport beteiligten Proteinen FhuA, FhuC und FhuB zeigten homologe Abschnitte (Abb.13), deren Bedeutung jedoch unklar ist.
Zu den an Bindeprotein abhängigen Transportsystemen beteiligten Proteinen MalE (36), HisJ (67), BtuE (42) und PhoS (86, 120) konnten keine Homologien gefunden werden.

Ala(A)	32/25	Glu(E)	13/12	Leu(L)	39/30	Ser(S)	17/14
Arg(R)	19/15	Gln(Q)	8/ 7	Lys(K)	8/ 8	Thr(T)	13/11
Asn(N)	11/ 9	Gly(G)	18/17	Met(M)	14/11	Trp(W)	8/ 6
Asp(D)	17/16	His(H)	5/ 4	Phe(F)	13/13	Tyr(Y)	7/ 7
Cys(C)	1/ 1	Ile(I)	13/10	Pro(P)	22/18	Val(V)	18/17

Abb.19: Aminosäurezusammensetzung von FhuD. Die Werte entsprechen den Startcodons 1 und 5.

Phe	TTT 9	Ser	TCT 1	Tyr	TAT 5	Cys	TGT 1
	TTC 4		TCC 0		TAC 2		TGC 0
Leu	TTA 7		TCA 2	*	TAA 0	*	TGA 1
	TTG 7		TCG 5	*	TAG 0	Trp	TGG 8
Leu	CTT 6	Pro	CCT 5	His	CAT 2	Arg	CGT 7
	CTC 3		CCC 2		CAC 3		CGC 11
	CTA 1		CCA 6	Gln	CAA 3		CGA 1
	CTG 15		CCG 9		CAG 5		CGG 0
Ile	ATT 5	Thr	ACT 0	Asn	AAT 3	Ser	AGT 3
	ATC 9		ACC 5		AAC 8		AGC 6
	ATA 0		ACA 1	Lys	AAA 7	Arg	AGA 0
Met	ATG 13		ACG 7		AAG 1		AGG 0
Val	GTT 2	Ala	GCT 2	Asp	GAT 10	Gly	GGT 6
	GTC 7		GCC 6		GAC 7		GGC 7
	GTA 1		GCA 6	Glu	GAA 11		GGA 4
	GTG 8		GCG 18		GAG 2		GGG 1

Abb.20: Codongebrauch des fhuD Gens, vom längsten offenen Leseraster ausgehend.

3.9. Lokalisierung von FhuD mit dem T7 System

In früheren Versuchen wurde FhuD in der Cytoplasmamembran lokalisiert (39). Mit Hilfe des T7 Systems (122) sollte untersucht werden, ob FhuD in geringen Mengen auch ins Periplasma ausgeschieden wird. Dazu wurde das 3,0kb SalI/EcoRI Fragment aus pPF3/V1, das fhuD und fhuB enthalten sollte, in den Vektor pT7-6 hinter den Phagenpromotor Ø10 kloniert, der spezifisch von der RNA Polymerase des T7 Phagen erkannt wird. Das Plasmid pGP1-2 trägt das Strukturgen für die T7 RNA Polymerase hinter dem temperaturinduzierbaren p_LPromotor. Beide Plasmide wurden gemeinsam im Stamm WM1576 exprimiert. ^{35}S-Methionin markierte Zellen von zwei Klonen, die nach der Restriktionsanalyse identische Inserts tragen, wurden untersucht. Proben ganzer Zellen zeigen nach Auftrennung in der SDS PAGE bei beiden Stämmen fünf Banden von 31/30K, 29K 28K und 27K (Abb21), die den Startcodons 2-6 (Tab.2) entsprechen. Ein Nachweis des exakten Startpunkts von FhuD war damit nicht möglich. Die Proteine von 31K und 27K finden sich erstaunlicherweise in der äußeren Membran beider Stämme, sind jedoch nur in geringen Mengen in der Cytoplasmamembran eines Klons nachzuweisen. Die mit 57K bestimmte diffuse Proteinbande, die ebenfalls nur in ganzen Zellen und in der Cytoplasmamembran einer Probe zu finden ist, entspricht der Größe des FhuB Proteins (78), konnte jedoch bisher nur in ungekochten Proben im Gel gefunden werden. In der periplasmatischen Fraktion konnten keine markierten Proteine nachgewiesen werden.

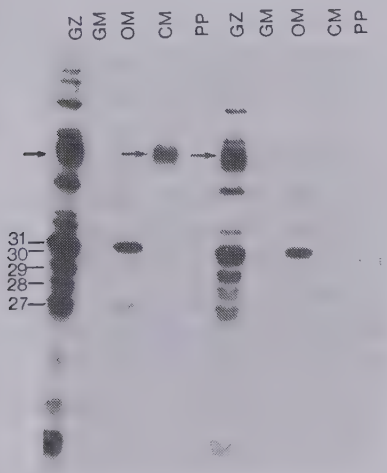


Abb.21:
Fluorographie eines Polyacrylamidgels (11%) mit ^{35}S-Methionin markierten Proben zweier Klone des T7 Systems.
GZ: Gesamtzellen, GM: Gesamtmembran, OM: äußere Membran, CM: Cytoplasmamembran, PP: Periplasma. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min. gekocht. Die Größen der FhuD Proteine sind an der linken Seite der Abbildung angegeben. FhuB ist durch einen Pfeil markiert.

4. DISKUSSION

Die Nukleotidsequenzen von FhuA und den ebenfalls tonB abhängigen Rezeptorproteinen FepA (85), Iut (79) und BtuB (64) sind bekannt. Vergleiche der Primärstrukturen zeigen fünf verschiedene Homologiebereiche an jeweils vergleichbaren Positionen (23,85). Auch im TonB Protein sind zwei Konsensussequenzen vorhanden.

Die am besten untersuchte Region liegt im Aminoterminus der Proteine (Abb.8) und zeigt eine charakteristische Anordnung von sieben Aminosäuren: Auf eine negativ geladene Aminosäure (Asparaginsäure/Glutaminsäure) folgen Threonin und zwei hydrophobe Aminosäuren. Den Abschluß bildet die Folge Valin-X-Alanin. Aminoterminale Sequenzen von FhuE und Colicin M, dessen Aufnahme in die Zelle ebenfalls tonB abhängig ist, weisen ebenfalls die als "TonB Box" bezeichnete Homologie auf (77,111).
Für das Vitamin B12 Transportsystem wurde eine btuB451 Mutante mit einem veränderten Rezeptorprotein beschrieben, die Vitamin B12 zwar binden, aber nicht mehr aufnehmen kann (6,76). Alle anderen BtuB Funktionen blieben vollständig erhalten. Daraus wurde geschlossen, daß die primäre Bindestelle für Vitamin B12 noch intakt geblieben war und die Mutation einen Bereich betraf, der für die Interaktion des Rezeptors mit TonB wichtig war (6). Heller und Kadner konnten durch DNA Sequenzierung zeigen, daß die Mutation durch einen Austausch der Aminosäure Leucin zu Prolin am Aminoterminus verursacht wurde (64).
Gegenwärtig wird mit Hilfe der Oligonukleotid Mutagenese untersucht, ob eine Veränderung der Proteine FhuA und Iut in dem btuB451 entsprechenden Bereich Auswirkungen auf tonB abhängige Funktionen zur Folge hat (114).
Eine Wechselwirkung der Rezeptoren mit dem TonB Protein kann nur dann stattfinden, wenn die TonB Box der Proteine vom Periplasma her zugänglich ist. Das Hydrophobizitätsprofil von FhuA zeigt, daß dieses Segment eher hydrophil ist (Abb.7). Eine Orientierung zum Periplasma hin ist damit möglich.
Kompetitionsexperimente zwischen Ferrichrom und dem Phagen T5 stützen eine Modellvorstellung, nach der die Aktivität des

FhuA Rezeptors von TonB allosterisch reguliert wird (41). TonB bewirkt eine erniedrigte Affinität von Ferrichrom zu FhuA. In tonB Mutanten liegt das FhuA Protein in einer Konformation vor, die Ferrichrom stabil bindet.
In Stämmen, die TonB überproduzieren, ist der Transport von Ferrichrom vermindert (88). Dieses Ergebnis stimmt mit dem vorgeschlagenen Modell überein. Eine Überproduktion des ExbB Proteins führt ebenfalls zu einer verringerten Ferrichromaufnahme der Zellen (37).

Um nähere Informationen über die Funktion des Carboxyterminus zu erhalten, wurden Fusionsproteine erzeugt, die den aminoterminalen Teil des FhuA Proteins und den Carboxyterminus des Vitamin B12 Rezeptors BtuB oder des Aerobactin Rezeptors Iut enthielten (125). Das FhuA-BtuB Hybridprotein hat alle Eigenschaften beider Proteine verloren, sitzt jedoch noch in der äußeren Membran. Die FhuA-Iut Chimäre hat 24 carboxyterminale Aminosäuren von FhuA gegen die letzten 19 Aminosäurereste von Iut ausgetauscht. Dieses Produkt wurde ebenfalls in der äußeren Membran nachgewiesen. Die Zellen zeigten noch Sensitivität gegen die Phagen T5 und T1, waren aber unempfindlich gegen Albomycin und wuchsen nicht mehr mit Ferrichrom. Für diesen Phänotyp wurden zwei mögliche Erklärungen diskutiert. Die entsprechenden Bindestellen können deletiert sein, oder die Struktur des Rezeptors ist verändert. Letztere Möglichkeit schien wahrscheinlicher zu sein, da der Carboxyterminus des Fusionsproteins hydrophiler ist und wahrscheinlich eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, die auch eine vor der Fusionsstelle liegende Bindestelle blockieren kann. Eine Beteiligung der einzigen vor der Fusionsstelle liegenden carboxyterminalen Homologie (Asn-Leu-Phe-Asp) an der Ferrichromaufnahme kann damit nicht ausgeschlossen werden. Jedoch kann diesem Abschnitt des FhuA Proteins bis jetzt auch keine definierte Funktion zugeordnet werden. Die Bindestelle für Vitamin B12 im BtuB Rezeptor liegt im Carboxyterminus (65). Zellen, die verkürztes Protein synthetisieren, sind zwar noch sensitiv gegen BF23 Phagen, können aber nicht mehr mit Vitamin B12 wachsen. Die Bindestelle für Aerobactin wird dagegen im N Terminus vermutet (79).

In einer früheren Arbeit wurden FhuA Mutanten beschrieben, deren verändertes Rezeptorprotein zwar noch in die Membran eingelagert war und in der SDS Gelelektrophorese dieselbe Größe wie FhuA aufwies, das jedoch außer einer partiellen Sensitivität gegen T5 Phagen alle FhuA determinierten Funktionen verloren hatte (58). Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß die Funktionsdomänen für sämtliche Substrate eng beieinanderliegen. Auf molekularer Ebene waren diese Mutanten nicht näher charakterisiert.

Verkürzte Proteine stellen eine weitere Möglichkeit dar, durch den schrittweisen Verlust verschiedener Funktionen die dafür verantwortlichen Bereiche zu lokalisieren. Im Gegensatz zu OmpA (26) wird C terminal verkleinertes FhuA nicht mehr in die Membran eingelagert (73). Seine Funktionen können nicht mehr geprüft werden. Jackson et. al. schlugen vor, daß der Carboxyterminus des FhuA Proteins für das korrekte Inserieren in die äußere Membran wichtig ist (73).

Auch in diesem Fall bietet sich die Methode der "site directed mutagenesis" an, um physiologische Veränderungen nach Mutation der Konsensussequenz zu erforschen.

Vergleiche der Nukleotidsequenzen zeigten, daß die Homologien der Rezeptorproteine wahrscheinlich nicht auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückzuführen sind, sondern sich aufgrund ähnlicher Funktionen entwickelt haben (23,85).

Ein Transport von Substraten durch die Cytoplasmamembran erfolgt nur, wenn ein spezifisches Aufnahmesystem vorhanden ist. Eine Möglichkeit des Stofftransports stellen Bindeprotein unabhängige Permeasen wie LacY dar, das als ein integrales Membranprotein charakterisiert ist (63).

Eine größere Anzahl aktiver Transportsysteme ist durch das Vorhandensein eines periplasmatischen substratbindenden Proteins gekennzeichnet (2). Diese schocksensitiven Systeme zeigen noch weitere Gemeinsamkeiten. Sie besitzen zwei hydrophobe integrale Membranproteine und ein membranassoziiertes Protein. Zur Energetisierung sind ATP oder engverwandte Nu-

kleotide erforderlich (2). Ein Vergleich dieser membranassoziierten Komponenten verschiedener Transportsysteme wie HisP (67), MalK (30), PstB (121), OppD (68) und BtuD (42) läßt zwei hochkonservierte Bereiche am Aminoterminus und ungefähr in der Mitte des Proteins erkennen, die als Nukleotid bindende Stellen beschrieben und auch in FhuC vorhanden sind (Abb.17). Diese homologen Sequenzen wurden nicht nur in ATPasen von Pro- und Eukaryonten entdeckt (68,127), sondern sind interessanterweise auch in der Primärstruktur einer Reihe von Proteinen vorhanden, die an so verschiedenen Funktionen wie Zellteilung, Proteinexport und Nodulation beteiligt sind (69). Für HisP, MalK und OppD ließ sich eine ATP Bindung nachweisen (68,70), Hydrolyse von ATP konnte hingegen nicht gezeigt werden. Es wird deshalb diskutiert, daß ATP nicht hydrolysiert wird und das gebundene Nukleotid regulatorische Funktionen erfüllt (69).
Für die Nukleotid bindende ß Untereinheit der F_1ATPase aus E. coli und die Adenylatkinase wurden bereits Modelle erstellt, die eine Beteiligung der Konsensussequenzen an der Ausbildung ATP bindender Strukturen wahrscheinlich machen (35,46). FhuC zeigt keine ausgeprägte Hydrophobizität und wird ohne Signalsequenz synthetisiert. Diese Daten sprechen für ein membranassoziiertes Protein mit einer dem Cytoplasma zugewandten Nukleotidbindestelle, wie sie für HisP, MalK und OppD vorgeschlagen wurde (2). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß Eisenhydroxamat- und Bindeprotein abhängige Transportsysteme einen ähnlichen Energiekopplungsmechanismus haben. In weiteren Versuchen sollte es gelingen, die Bindung von ATP an FhuC nachzuweisen.

Die Ergebnisse verschiedener Kompetitionsstudien zwischen T5 Phagen und Ferrichrom mit fhuCDB Mutanten zeigen, daß eine Interaktion zwischen den Proteinen der Cytoplasmamembran und äußerem Membranrezeptor wahrscheinlich ist (41). In Vergleichen der Primärstruktur von FhuC mit FhuA, FhuD und FhuB wurden ebenfalls homologe Bereiche gefunden (Abb.13), deren Bedeutung jedoch erst durch Mutagenese und daraus resultierenden veränderten Funktionen geklärt werden kann. Auch das Nu-

kleotid bindende BtuD Protein zeigt Homologien zum Rezeptor BtuB (42).

Der Beginn des FhuD Proteins konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Das erste und fünfte Startcodon zeichnen sich durch eine zugehörige Ribosomenbindestelle aus (Tab.2). Sekundärstrukturen der mRNA im Bereich des Translationsstarts und der Ribosomenbindestelle spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Initiation der Translation (47,81). Im Bereich beider Startcodons sind ähnliche Sekundärstrukturen vorhanden, so daß auch daraus auf keinen bevorzugten Startpunkt von FhuD geschlossen werden kann.
Wird die Sequenz von Startcodon 1 an translatiert, überlappen Stop und Start von FhuC und FhuD (TGATG). Auch FhuD und FhuB besitzen gekoppelte Stop- und Startpunkte (78). Diese Anordnung von Genen stellt ein weitverbreitetes Phänomen bei Operons von Biosynthesegenen dar und wird als translational coupling bezeichnet. Neuere Arbeiten zeigen jedoch, daß auch bei einem Abstand von 3 - 67bp zwischen zwei Genen eine gekoppelte Translation möglich ist (1). Wird FhuD vom fünften Startcodon aus translatiert, ist die intercistronische Region 134bp lang.
Fecker beschreibt eine schwache Komplementation einer fhuDB Mutante mit einem Deletionsplasmid, dem Startcodon 1 fehlt (39). Dies läßt sich als Beginn des Proteins bei Startcodon 5 interpretieren.
Auch die Expression des SalI/EcoRI Fragments, auf dem FhuD vom zweiten Startpunkt an kodiert ist, ließ im T7 System keine eindeutige Aussage bezüglich des Beginns des Proteins zu. Die gebildeten Proteine von 31,30,29,28 und 27K entsprechen den möglichen Startpunkten 2 - 6. Beginnt FhuD jedoch vor der SalI Schnittstelle, sind diese Proteine aminoterminal verkürzt. Ihr Laufverhalten in der SDS PAGE unterscheidet sich damit von dem in Maxizellen nachgewiesenen funktionsfähigen FhuD Protein von 26K (39). Für das TonB Protein wurden solche vom Aminoterminus abhängigen Effekte bereits beschrieben (104).
Weitere Versuche sollten zeigen, ob das längste offene Leseraster (Startcodon 1) für ein Protein kodiert, dessen Molekulargewicht in der SDS PAGE mit dem von Maxizellen synthetisierten 26K Protein übereinstimmt.

Eine eindeutige Aussage über den tatsächlichen Beginn des FhuD Proteins ist erst nach Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz möglich.
Für Bindeprotein abhängige Aufnahmesysteme ist ein periplasmatisches Bindeprotein erforderlich, welches sein Substrat spezifisch bindet. Nach der Aminosäuresequenz trägt FhuD wie die periplasmatischen Proteine MalE (36), BtuE (42), HisJ (67) und PhoS (120) eine negative Gesamtladung. Betrachtet man das größte mögliche Protein, das bei Startcodon 1 beginnt, so findet man am Aminoterminus drei positive Ladungen, gefolgt von einem hydrophoben Segment und einer Erkennungssequenz Ala-His-Ala-Ala-Ala für die Signalpeptidase (62). Jedoch sind auch Proteine der Cytoplasmamembran bekannt, die eine Signalsequenz tragen (43). Diese Proteine sind in der inneren Membran verankert, größere hydrophile Abschnitte ragen ins Periplasma. Es wird vermutet, daß die Signalsequenz den Transfer dieser Proteinteile ins Periplasma erleichtert (119). Betrachtet man das Hydrophobizitätsprofil von FhuD, ist es ebenfalls denkbar, daß Amino- und Carboxyterminus in der Membran verankert sind, während die hydrophileren Strukturen im Periplasma zu finden sind und die Funktion eines Bindeproteins für Eisen(III)Hydroxamate erfüllen. Beginnt FhuD mit dem fünften Startcodon, fehlt eine Signalsequenz völlig. Die membranbindenden hydrophoben Anteile bleiben jedoch erhalten.
Gegen ein periplasmatisches FhuD Bindeprotein spricht auch ein weiterer Befund. In Schockexperimenten konnte kein solches Protein nachgewiesen werden (72). Im Unterschied zum Eisen-Dicitrattransportsystem, für das ein periplasmatisches Protein FecB gezeigt werden konnte (105,135), war der Ferrichromtransport nicht wesentlich vermindert. Für das Vitamin B12 Aufnahmesystem wurde ein periplasmatisches Protein gefunden (13,42).

Die Nukleotidsequenz der am Eisenhydroxamattransport beteiligten Proteine FhuA, FhuC, FhuD und FhuB ist vollständig bekannt. Analog zum Vitamin B12 Transport erfolgt die Bindung des Liganden an einen spezifischen Rezeptor der äußeren Membran. Die Aufnahme durch die Cytoplasmamembran wird von drei

weiteren Proteinen vermittelt: von einem membranassoziierten Nukleotid Bindeprotein (FhuC), einem integralen Membranprotein (FhuB) (78) und einer vermutlich bindeproteinähnlichen Komponente (FhuD).
In früheren Arbeiten wurde zwar gezeigt, daß mit Eisen beladenes Ferrichrom nach Reduktion und Freisetzung des Eisens modifiziert und in acetylierter Form wieder ausgeschieden wird (60). Unklar ist jedoch, wo dieser Prozess stattfindet und welche Rolle dabei den Komponenten FhuC, FhuD und FhuD zukommt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Am Ferrichromtransport sind vier Gene beteiligt: fhuA kodiert für den spezifischen Rezeptor der äußeren Membran, die Genprodukte FhuC, FhuD und FhuB sind am Transport aller Eisenhydroxamate durch die Cytoplasmamembran beteiligt.
Die Organisation des fhu Operons ist in Abb.22dargestellt.
Die Gene fhuA, fhuC und fhuD wurden in der vorliegenden Arbeit sequenziert.
FhuA ist auf einem 2,8kb großen SphI/SmaI Fragment lokalisiert. Ein 2241bp großes offenes Leseraster kodiert für ein Protein von 747 Aminosäuren mit einer 33 Aminosäuren langen Signalsequenz. Das reife Protein hat ein Molekulargewicht von 78992 D. Vergleiche der Primärstruktur des FhuA Proteins mit den Aminosäuresequenzen der ebenfalls tonB abhängigen Rezeptorproteinen FepA, Iut, BtuB und FhuE (Aminoterminus) zeigten fünf Homologiebereiche auf. Für die aminoterminale Sequenz wird eine Beteiligung an tonB abhängigen Prozessen vermutet.
FhuC liegt innerhalb des 900bp großen PvuII/SalI Fragments. Nach DNA Sequenzierung wurde ein 795bp großes offenes Leseraster gefunden. Das zugehörige Protein besteht aus 265 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29255 D. FhuC zeigt ausgeprägte Homologien zu ATP bindenden Proteinen, die am Bindeprotein abhängigen Transport beteiligt sind. Das Fehlen einer Signalsequenz und das Ausmaß der Hydrophobizität lassen auf ein membranassoziiertes Protein schließen.
Für fhuD wurde ein langes offenes Leseraster von 888 Nukleotiden gefunden, das mehrere mögliche Startcodons im selben Raster enthält. Startcodon 1 und 4 haben auch zugehörige Ribosomenbindestellen. Beginnt die Translation am vierten Startcodon, resultiert daraus ein Protein mit einem Molekulargewicht von 28282 D, das keine Signalsequenz hat und mit dem in einer früheren Arbeit bestimmten Molekulargewicht von 26K übereinstimmt. FhuD zeigt nach Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle zwei ausgeprägt hydrophobe Bereiche am Amino- und am Carboxyterminus, die eine Verankerung des Proteins in der Cytoplasmamem-

bran erlauben. Beide Proteine wurden in der Cytoplasmamembran nachgewiesen.
Die Gene fhuACDB werden in derselben Richtung transkribiert. Eine polycistronische mRNA erscheint wahrscheinlich. Der intergene Bereich vor fhuC weist jedoch auch eigene Promotorstrukturen auf, die eine Transkription ermöglichen.

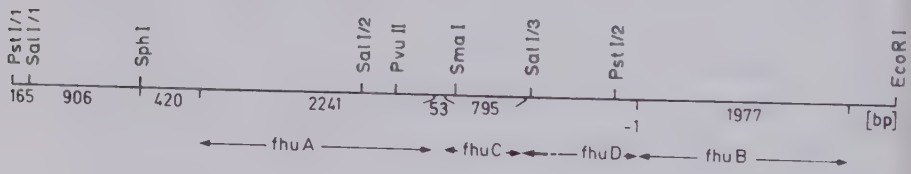


Abb. 22: Organisation der gesamten fhu Region. Angegeben ist die Anzahl der Basenpaare der offenen Leseraster und der intergenen Bereiche. FhuD wurde mit dem größten offenen Leseraster eingezeichnet. Die Transkriptionsrichtung verläuft von links nach rechts.

6. LITERATUR

1 Aksoy,S.,Sqires,C.L.,Sqires,C. (1984)
Translational coupling of the trpB and trpA Genes in the Escherichia coli Tryptophan Operon
J.Bacteriol. 157:363-367

2 Ames,G.F.-L. (1986)
Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism, and Evolution
Ann.Rev.Biochem. 55:397-425

3 Ames,G.F.-L.,Prody,C.,Kustu,S. (1984)
Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform
J.Bacteriol. 160:1181-1183

4 Ansorge,W.,Barker,R. (1984)
System for DNA sequencing with resolution up to 600 base pairs
J.Biochem.Biophys.Methods 9:33-47

5 Archibald,F. (1983)
Lactobacillus plantarum, an organism not requiring iron
FEMS Microbiol.Lett. 19:29-32

6 Bassford,P.J.,Jr.,Kadner,R.J. (1977)
Genetic analysis of compounds involved in vitamin B12 uptake in Escherichia coli
J.Bacteriol. 132:796-805

7 Becerril,B.,Valle,F.,Merino,E.,Riba,L.,Bolivar,F. (1985)
Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in the Escherichia coli gdhA gene
Gene 37:53-62

8 Biggin,M.D.,Gibson,T.J.,Hong,G.F. (1983)
Buffer-gradient gels and 35S-label as an aid to rapid DNA sequence determination
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:3963-3965

9 Bindereif,A.,Braun,V.,Hantke,K. (1982)
The cloacin receptor of ColV-bearing Escherichia coli is part of the Fe^{3+}-aerobactin transport system
J.Bacteriol. 150:1472-1475

10 Bindereif,A.,Neilands,J.B. (1985)
Promotor mapping and transcriptional regulation of the iron assimilation of plasmid ColV-K30 in Escherichia coli

11 Birnboim,H.C. (1983)
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA
in:Methods in enzymology,Volume 100(Wu,R.,Grossman,L., Moldave,K.,eds.) Academic Press, New York pp.95-163

12 Bonner,W.M.,Laskey,R.A. (1974)
A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels
Eur.J.Biochem. 46:83-88

13 Bradbeer,C.,Kenley,J.S.,DiMasi,R.,Leighton,M. (1978)
Transport of vitamin B12 in Escherichia coli. Corrinoid specifities of the periplasmic B12-binding protein and of energy-dependent B12 transport
J.Biol.Chem. 253:1347-1352

14 Braun,V. (1983)
Regulation of iron uptake in Escherichia coli
in:Microbiology 1983 (Schlesinger,D.,ed.)
ASM pp.301-305

15 Braun,V. (1985)
The iron transport systems of E.coli
in:The enzymes of biological membranes, Vol.3 (Martonosi,A.N.,ed
Plenum Publishing Corporation

16 Braun,V. (1985)
Iron supply as a virulence factor
in:The pathogenesis of bacterial infections, pp.168-176
Springer-Verlag Berlin Heidelberg

17 Braun,V.,Burkhardt,R.,Schneider,R.,Zimmermann,L. (1980)
Chromosomal genes for ColV plasmid determined F^{3+}-aerobactin transport in Escherichia coli
J.Bacteriol. 152:553-559

18 Braun,V.,Fischer,E.,Hantke,K.,Heller,K.,Rotering,H. (1985)
Functional aspects of gram-negative cell surfaces
in:Subcellular Biochemistry, Vol.11 (Roodyn,D.B.,ed.)
Plenum Publishing Corporation

19 Braun,V.,Gross,R.,Köster,W.,Zimmermann,L. (1983)
Plasmid and chromosomal mutants in the iron(III)-aerobactin transport system of Escherichia coli
Mol.Gen.Genet. 192:131-139

20 Braun,V.,Hancock,R.E.W.,Hantke,K.,Hartmann,A. (1976)
Functional organisation of the outer membrane of E.coli: phage and colicin receptors as components of iron transport systems
J.Supramol.Struct. 5:37-58

21 Braun,V.,Hantke,K. (1981)
Bacterial cell surface receptors
in:Organization of the procaryotic cell membranes, Vol.II (Gosh,B.K.,ed.),CRC Press, Inc. Boca Raton,Fla., pp.1-79

22 Braun,V.,Hantke,K. (1982)
Receptor dependent transport systems in E.coli for iron complexes and vitamin B12
in:Membranes and transport, Vol.2 (Martonosi,A.N.,ed.)
Plenum Press, New York and London pp.107-113

23 Braun,V.,Hantke,K.,Eick-Helmerich,K.,Köster,W.,Preßler,U., Sauer,M.,Schäffer,S.,Staudenmaier,H.,Zimmermann,L. (1986)
Iron transport systems in Escherichia coli, in:
Verlag Chemie Weinheim, in press

24 Braun,V.,Schaller,K.,Wolff,H. (1973)
A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of Escherichia coli B
Biochim.Biophys.Acta 333:87-97

25 Braun,V.,Wolff,H. (1973)
Charakterization of the receptor for phage T5 and colicin M in the outer membrane of E.coli B
FEBS Lett. 34:78-80

26 Bremer,E.,Cole,S.T.,Hindennach,I.,Henning,U.,Beck,E.,Kurz,C., Schaller,H. (1982)
Export of a Protein into the Outer Membrane of Escherichia coli K12. Stable Incorporation of the OmpA Protein Requires Less than 193 Amino-Terminal Amino-Acid Residues
Eur.J.Biochem. 122:223-231

27 Broome-Smith,J.K.,Edelman,A.,Yousif,S.,Spratt,B. (1985)
The nucleotide sequences of the ponA and ponB genes encoding penicillin-binding proteins 1A and 1B of Escherichia coli K12
Eur.J.Biochem. 147:437-446

28 Bullen,J.J.,Rogers,H.J.,Griffiths,E. (1974)
Bacterial iron metabolism in infection and immunity
in:Microbial iron metabolism (Neilands,J.B.,ed.)
Academic Press,Inc., New York pp.517-551

29 Coulton,J.W.,Mason,P.,Cameron,D.R.,Carmel,G.,Jean,R.,Rhode,H.N. (1986)
Protein fusions of ß-galactosidase to the ferrichrom-iron receptor of E.coli K12
J.Bacteriol. 165:181-192

30 Crosa,J.H. (1984)
The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence
Ann.Rev.Microbiol. 38:69-89

31 Dagert,M.,Ehrlich,S.D. (1979)
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells
Gene 6:23-28

32 DiRienzo,J.M.,Nakamura,K.,Inouye,M. (1978)
The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions
Ann.Rev.Biochem. 43:123-146

33 Doolittle,R.F.,Johnson,M.S.,Husain,I.,van Houten,B.,Thomas, D.C.,Sancar,A. (1986)
Domainal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins
Nature 323:451-452

34 Dretzen,G.,Bellard,M.,Sassone-Corsi,P.,Chambon,P. (1981)
A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels
Anal.Biochem. 112:295-298

35 Duncan,T.M.,Parsonage,D.,Senior,A.E. (1986)
Structure of the nucleotide binding domain in the ß-subunit of Escherichia coli F1-ATPase
FEBS Lett. 208:1-6

36 Duplay,P.,Bedouelle,H.,Fowler,A.,Zabin,I.,Saurin,W., Hofnung,M. (1984)
Sequences of the malE Gene and of its Product, the Maltose-binding Protein of Escherichia coli K12
J.Biol.Chem. 259:10606-10613

37 Eick-Helmerich,K.,Hantke,K.,Braun,V. (1987)
Cloning and expression of the exbB gene of Escherichia coli K12
Mol.Gen.Genet. 206:246-251

38 Evans,I.J.,Downie,J.A. (1986)
The nodI gene product of Rhizobium leguminosarum is closely related to ATP binding bacterial transport proteins;nucleotide sequence analysis of the nodI and nodJ genes
Gene 43:95-101

39 Fecker,L.Braun,V. (1983)
Cloning and expression of the fhu genes involved in the iron(III)-hydroxamate uptake of Escherichia coli
J.Bacteriol. 156:1301-1314

40 Felmlee,T.,Pellet,S.,Welch,R.A. (1985)
Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin
J.Bacteriol. 163:94-105

41 Fischer,E.,persönliche Mitteilung

42 Friedrich,M.J.,DeVeau,L.C.,Kadner,R.J. (1986)
Nucleotide sequence of the btuCED genes involved in vitamin B12 transport in Escherichia coli and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependent transport systems
J.Bacteriol. 167:928-934

43 Froshauer,S.,Beckwith,J. (1984)
The nucleotide sequence of the gene for malF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of Escherichia coli
J.Biol.Chem. 259:10896-10903

44 Frost,G.,Rosenberg,H. (1973)
The inducible citrate-dependent iron transport system in E.coli K12
Biochim.Biophys.Acta 330:90-101

45 Frost,G.,Rosenberg,H. (1975)
Relationship between the tonB locus and iron transport in Escherichia coli
J.Bacteriol. 124:704-712

46 Fry,D.C.,Kuby,S.A.,Mildvan,A.S. (1986)
ATP binding sites of adenylatkinase: Mechanistic implications of its homology with ras encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide binding proteins
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:907-911

47 Ganoza,M.C.,Kofoid,E.C.,Marlière,P.,Louis,B.G. (1987)
Potential secondary structure at translation-initiation sites
Nuc.Acids Res. 15:345-359

48 Gill,D.R.,Hatfull,G.F.,Salmond,G.P.C. (1986)
A new cell division operon in Escherichia coli
Mol.Gen.Genet. 205:134-145

49 Gilson,E.,Higgins,C.F.,Hofnung,M.,Ames,G.F.L.,Nikaido,H. (1982)
Extensiv homology between membrane-associated components of histidine and maltose transport of Salmonella typhimurium and Escherichia coli
J.Biol.Chem. 257:9915-9918

50 Gilsón,E.,Nikaido,H.,Hofnung,M. (1982)
Sequence of the malK gene in E.coli K12
Nuc.Acids Res. 10:7449-7458

51 Grewal,K.K.,Warner,P.J.,Williams,,P.H. (1982)
An inducible outer membrane protein involved in aerobactin iron transport by ColV strains of Escherichia coli
FEBS lett. 140:27-30

52 Grosjean,H.,Fiers,W. (1982)
Preferential codon usage in procaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes
Gene 18:199-209

53 Hancock,R.E.W.,Hantke,K.,Braun,V. (1976)
Iron transport in E.coli K-12, involvement of the colicin B receptor and of a citrate-inducible Protein
J.Bacteriol. 127:1370-1375

54 Hantke,K. (1978)
Major outer membrane proteins of E.coli K12 seve as receptors for the phages T2 (protein 1A) and 434 (protein 1B)
Mol.Gen.Genet. 164:131-135

55 Hantke,K. (1981)
Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K12: isolation of a constitutive mutant
Mol.Gen.Genet. 182:288-292

56 Hantke,K. (1982)
Negative control of iron uptake systems in Escherichia coli
FEMS Microbiol.Lett. 15:83-86

57 Hantke,K. (1983)
Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in Escherichia coli K-12
Mol.Gen.Genet. 191:301-306

57a Hantke,K. (1984)
Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in E.coli K-12
Mol.Gen.Genet. 197:337-341

58 Hantke,K.,Braun,V. (1978)
Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in E.coli
J.Bacteriol. 135:190-197

59 Hantke,K.,Zimmermann,L. (1981)
The importance of the exbB gene for vitamin B12 and ferric transport
FEMS Microbiol.Lett. 12:31-35

60 Hartmann,A.,Braun,V. (1980)
Uptake and modification of ferrichrom
J.Bacteriol. 143:246-255

61 Hartmann,A.,Fiedler,H.P.,Braun,V. (1979)
Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by Escherichia coli K-12
Eur.J.Biochem 99:517-524

62 van Heijne,G. (1985)
Signal sequences. The Limits of Variation
J.Mol.Biol. 184:99-105

63 Hengge,R.Boos,W. (1983)
Maltose and lactose transport in Escherichia coli. Examples of two different types of concentrativ transport systems
Biochim.Biophys.Acta 737:443-478

64 Heller,K.,Kadner,R.J. (1985)
Nucleotide sequence of the gene for the vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of Escherichia coli
J.Bacteriol. 161:904-908

65 Heller,K.,Mann,B.J.,Kadner,R.J. (1985)
Cloning and expression of the gene for the vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of Escherichia coli

66 Higgins,C.F.Ames,G.F.L.,Barnes,W.M.,Clement,J.M.,Hofnung,M. (1982)
A novel intercistronic regulatory element of procaryotic operons
Nature 298:760-762

67 Higgins,C.F.,Haag,P.D.,Nikaido,K.,Ardeshir,F.,Garcia,G., Ames,G.F.L. (1982)
Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of Salmonella typhimurium
Nature 298:723-727

68 Higgins,C.F.,Hiles,I.D.,Whalley,K.,Jamieson,D.J. (1985)
Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein dependent transport systems
EMBO J. 4:1033-1040

69 Higgins,C.F.,Hiles,I.D.,Salmond,G.P.C.,Gill,D.R.,Downie,J.A. Evans,I.J.,Holland,I.B.,Gray,L.,Buckel,C.D.,Bell,A.W., Hermodson,M.A. (1986)
A family of related ATP-binding subunits coupled to many

distinct biological processes in bacteria
Nature 323:448-450

70 Hobson,A.C.,Weatherwax,R.,Ames,G.F.L. (1984)
ATP binding sites in the membrane components of histidine permease, a periplasmic transport system
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:7333-7337

71 Hoffmann,H.,Dissertation, Universität Tübingen (1986)

72 Hussein,S.,Dissertation, Universität Tübingen (1980)

73 Jackson,M.E.,Pratt,J.M.,Holland.B.I. (1986)
Intermediates in the assembly of the TonA polypeptide into the outer membrane of Escherichia coli K12
J.Mol.Biol. 189:477-486

74 Jensen,K.F.,Bonekamp,F.,Poulsen,P. (1986)
Attenuation at nucleotide biosynthetic genes and aminoacid biosynthetic operons of Escherichia coli
TIBS 11:362-365

75 Kadner,R.J.,Heller,K.,Coulton,J.W.,Braun,V. (1980)
Genetic control of hydroxamate-mediated iron uptake in Escherichia coli

76 Kadner,R.J.,Liggins,G.L. (1973)
Transport of vitamin B12 in Escherichia coli: genetic studies
J.Bacteriol. 115:514-521

77 Köck,J.,Diplomarbeit, Universität Tübingen (1986)

77a Konigsberg,W.,Godson,G.N. (1983)
Evidence for use of rare codons in the dnaG gene and other regulatory genes of Escherichia coli
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:687-691

78 Köster,W.,Braun,V. (1986)
Iron hydroxamate transport of Escherichia coli: nucleotide sequence of the fhuB gene and identification of the protein
Mol.Gen.Genet. 204:435-442

79 Krone,W.J.A.,Stegehuis,F.,Konigstein,G.,van Doorn,C., Roosendahl,B.,de Graf,F.K.,Oudega,B. (1985)
Charakterization of the pCoIV-K30 encoded cloacin DF13/ aerobactin outer membrane receptor protein and analysis of its nucleotide sequence and primary structure
FEMS Microbiol.Lett. 26:153-161

80 Kyte,J.,Doolittle,R.F. (1982)
A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein
J.Mol.Biol. 157:105-132

81 Looman,A.C.,Bodlaender,J.,de Gruyter,M.,Vogelaar,A.,van Knippenberg,P.H. (1986)
Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal sites in Escherichia coli
Nuc.Acids Res. 14:5481-5497

82 Lugtenberg,B.,Peters,R.,Bernheimer,H.,Berendsen,W. (1976)
Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of E.coli
Mol.Gen.Genet. 147:251-262

83 Lugtenberg,B.,Neijers,J.,Peters,R.,van der Hock,P., van Alphen,L. (1975)
Electrophoretic resolution of the major outer membrane proteins of Escherichia coli into four bands
FEBS Lett. 58:254-258

84 Lugtenberg,B.,van Alphen,L. (1983)
Molecular architecture and functioning of the outer membrane of E.coli and other gram-negative bacteria
Biochim.Biophys.Acta 737:51-115

85 Lundrigan,M.D.,Kadner,R.J. (1986)
Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in Escherichia coli
J.Biol.Chem. 261:10797-10801

86 Magota,K.,Otsuji,N.,Miki,T.,Horiuchi,T.,Tsunasawa,S.,Kondo,J., Sakiyama,F.,Amemura,M.,Morita,T.,Shinagawa,H.,Nakata,A. (1984)
Nucleotide sequence of the phoS gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of Escherichia coli
J.Bacteriol. 157:772-778

87 Maniatis,T.,Fritsch,E.F.,Sambrock,J. (1982)
Molecular cloning - a laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory, New York

88 Mann,B.J.,Holroyd,C.D.,Bradbeer,C.,Kadner,R.J. (1986)
Reduced activity of TonB-dependent functions in strains of Escherichia coli
FEMS Microbiol.Lett. 33:255-260

89 McIntosh,M.A. (1983)
Genetics of ferric enterobactin transport in E.coli
in:Microbiology (Schlessinger,D.,ed.)
Am.Soc.Microbiol., Washington D.C., pp296-300

90 Mende,J.,Diplomarbeit, Universität Tübingen (1987)

91 Messing,J.,Crea,R.,Seeburg,P.H. (1981)
A system for shotgun DNA sequencing
Nuc.Acids Res. 9:309-321

92 Messing,J.,Vieira,J. (1982)
A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double digest restriction fragments
Gene 19:269-276

93 Michaelis,S.,Beckwith,J. (1982)
Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in E.coli
Ann.Rev.Microbiol. 36:435-465

94 Mizuno,T.,Chou,M.Y.,Inouye,M. (1983)
A comparative study on the genes for three porins of Escherichia coli outer membrane
J.Biol.Chem. 258:6932-6940

95 Morgan,W.D.,Bear,D.G.,Litchman,B.L.,von Hippel,P.H. (1985)
RNA sequence and secondary structure requirements for rho-dependent transcription termination
Nuc.Acids Res. 13:3739-3754

96 Neilands,J.B. (1981)
Microbial iron compounds
Ann.Rev.Biochem. 50:715-731

97 Neilands,J.B.,Bindereif,A.,Montgomerie,J.Z. (1986)
Genetic basis of iron assimilation in pathogenic E.coli
in:Genetic approaches to microbial pathogenicity (Goebel,W.,ed.)
Springer Verlag Berlin Heidelberg

98 Newbury,S.F.,Smith,N.H.,Robinson,E.C.,Hiles,J.D.,Higgins,C.F. (1987)
Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences
Cell 48:297-310

99 Nikaido,H.,Nakae,T. (1979)
The outer membrane of gram-negative bacteria
in:Advances in Microbial Physiology, Vol.20 (Rose,A.H.,Morris,J.G. eds.), Academic Press, London

100 OBrien,I.G.,Gibson,F. (1970)
The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-benzoylserin conjugates from Escherichia coli
Biochim.Biophys.Acta 237:537-549

101 Osborn,M.J.,Wu,H.P.C. (1980)
Proteins of the outer membrane of gram-negativ bacteria
Ann.Rev.Microbiol. 34:369-422

102 Pierce,J.R.,Earhart,C.F. (1986)
Escherichia coli K12 envelope proteins required for ferri-enterobactin uptake
J.Bacteriol. 166:930-936

103 Pierce,J.R.,Rickett,C.L.,Earhart,C.F. (1983)
Two fep genes are required for ferrienterochelin uptake in E.coli K12
J.Bacteriol. 155:330-336

104 Postle,K.,Good,R.F. (1983)
DNA sequence of the Escherichia coli tonB gene
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:5235-5239

105 Preßler,U.,persönliche Mitteilung

106 Pugsley,A.P.,Reeves,P. (1976)
Charakterisation of the group B colicin-resistent mutants of E.coli K12: colicin resistence and the role of enterochelin
J.Bacteriol. 127:218-228

107 Rogers,H.J. (1983)
Role of iron chelators, antibodies and iron-binding proteins in infection
in:Microbiology (Schlessinger,D.,ed.), pp.334-337
Am.Soc.Microbiol., Washington D.C.

108 Rosenberg, M.,Court,D. (1979)
Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription
Ann.Rev:Genet. 13:319-353

109 Sanger,F.,Coulson,A.R. (1978)
The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing
FEBS Lett. 87:107-110

110 Sanger,F.,Nicklen,S.,Coulson,A.R. (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5467

111 Sauer,M.,Diplomarbeit, Universität Tübingen (1986)

112 Schäffer,S.,Hantke,K.,Braun,V. (1985)
Nucleotide sequence of the iron regulatory gen fur
Mol.Gen.Genet. 200:110-113

113 Schnaitman,C.A. (1971)
Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100
J.Bacteriol. 108:545-552

114 Schöffler,H.,persönliche Mitteilung

115 Schreier,P.H.,Cortese,R. (1979)
A fast and simple method for sequencing DNA cloned into the single stranded bacteriophage M13
J.Mol.Biol. 129:169-172

116 Shine,J.,Dalgarno,L. (1974)
Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes
Nature 254:34-38

117 Spiro,T.G.,Saltman,P. (1969)
Polynuclear complexes of iron and their biological implications
Struct.Bonding 6:116-156

118 Stern,M.,Ames,G.F.L.,Smith,N.H.,Robinson,E.C.,Higgins,C.F. (1984)
Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genom
Cell 37:1015-1026

119 Sjöström,M.,Wold,S.,Wieslander.Å.,Rilfors,L. (1987)
Signalpeptide amino acid sequences in Escherichia coli contain information related to final protein localization. A multivariate data analysis
EMBO 6:823-831

120 Surin,B.P.,James,D.A.,Fimmel,A.L.,Shaw,D.C.,Cox,G.B., Rosenberg,H. (1984)
Structural gene for the phosphate repressible phosphate-binding protein of Escherichia coli has its own promotor: complete nucleotide sequence of the phoS gene
J.Bacteriol. 157:772-778

121 Surin,B.P.,Rosenberg,H.,Cox,G.B. (1985)
Phosphate-specific transportsystem of Escherichia coli:
Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships
J.Bacteriol. 161:189-198

122 Tabor,S.,Richardson,C.C. (1985)
A bacteriophage T7 polymerase/promotor system for controlled
exclusive expression of specific genes
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:1074-1078

123 Van Tiel-Menkveld,G.,Mentjox-Vervuurt,J.M.,Oudega,B.,
de Graaf,F.K. (1982)
Siderophore production by Enterobacter cloacae and a common
receptor protein for the uptake of aerobactin and cloacin DF13
J.Bacteriol. 150:490-497

124 Timmis,K.,Cabello,F.,Cohen,S.N. (1978)
Cloning and charakterization of EcoRI and HinDIII restriction
endonuclease-generated fragments of antibiotic resistance
plasmids R6-5 and R6
Mol.Gen.Genet. 162:121-137

125 Vieira,J.,Messing,J. (1982)
The pUC plasmids, an M13 mp7 derived system for insertion
mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers
Gene 19:259-268

126 Wagegg,W.,Braun,V. (1981)
Ferric citrate transport in E.coli requires outer membrane
protein FecA
J.Bacteriol. 145:156-163

127 Walker,E.,Saraste,M.,Runswick,M.J.,Gay,N.J. (1982)
Distantly related sequences in the and ß subunits of ATP
synthase, myosin kinases and other ATP requiring enzymes
and a common nucleotide binding fold
EMBO J. 1:945-951

128 Wayne,R.,Neilands,J.B. (1975)
Evidence for common binding sites for ferrichrom compounds
and bacteriophage Ø80 in the cell envelope of E.coli
J.Bacteriol. 121:497-507

129 Weinberg,E.D. (1978)
Iron and infection
Microbiol.Rev. 42:45-66

130 Woessner,J.P.,Gillham,N.W.,Boynton,J.E. (1986)
The sequence of the chloroplast atpB gene and its flanking
regions in Chlamydomonas reinhardtii
Gene 44:17-28

131 Wookey,P.,Hussein,S.,Braun,V. (1981)
Functions in outer and inner membrane of Escherichia coli
for ferrichrom transport
J.Bacteriol. 146:1158-1161

132 Wookey,P.,Rosenberg,H. (1978)
Involvement of inner and outer membrane components in the transport of iron and in colicin B action in E.coli
J.Bacteriol. 133:661-666

133 Yanish-Perron,C.,Vieira,J.,Messing,J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC19 vectors
Gene 33:103-119

134 Yanofsky,C. (1981)
Attenuation in the control of expression of bacterial operons
Nature 289:751-758

135 Zimmermann,L.,persönliche Mitteilung

7. ANHANG: Plasmidkonstruktionen

PLASMID	VEKTOR	INSERT	GENE	BEMERKUNGEN
pRB123	pUC19	5,6kb PstI/PstI	AC(D)	plac←
pRB17	pUC19	4,2kbAsuII/PstI	AC(D)	plac← 5'verkürzter Promotorbereich
pRB124	pUC19	5,6kb PstI/PstI	AC(D)	plac→
pRB120	pUC19	1,9kb SalI/SalI	(A)C	plac→
pRB230	pUC18	1,9kb PvuII/PstI	C(D)	plac→
pRB32	pUC19	1,9kb PvuII/PstI	C(D)	plac←
pRB20	pUC18	0,9kb SmaI/SalI	(C)	plac→ Fusionsprotein mit ß Galaktosidase
pRB200	pUC18	0,9kb SmaI/SalI	(C)	plac→ Stopcodon zwischen ß Galaktosidase und fhuC durch EcoRI Verdau, abgeleitet von pRB20
pRB12	pUC19	1,6kb EcoRV/EcoRV	(A)(C)	plac→
pRB21	pUC19	1,6kb EcoRV/EcoRV	(A)(C)	plac←
pRB62 pRB66	pT7-6	3,0kb SalI/EcoRI	DB	enthält fhuD ab Startcodon 2

Erläuterungen: INSERT: gibt Größe und begrenzende Schnittstellen des klonierten Fragments an (Abb.10,22)
GENE: ( ) gibt an, daß das Gen nicht vollständig auf dem Fragment enthalten ist
plac→ und plac← geben die Transkriptionsrichtung mit(→)und gegen(←) den lac Promotor des Plasmids orientiert an.

LEBENSLAUF

	Renate Burkhardt
11. März 1954	geboren in Freudenstadt
1961 - 1965	Grundschule Pfalzgrafenweiler
1965 - 1966	Realschule Pfalzgrafenweiler
1966 - 1974	Kepler-Gymnasium Freudenstadt
31. Mai 1974	Abitur
1974 - 1976	Staatliche Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin am Hygiene-Institut in Tübingen
16. Sept. 1976	Staatliche Prüfung für medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten
WS 1976/77	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
23. Okt. 1978	Diplomvorprüfung in Biologie
18. Febr. 1983	Diplomhauptprüfung in Biologie Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Universität Tübingen, mit dem Titel: Eisenversorgung von Escherichia coli mit Aerobactin
April 1983 - Mai 1987	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, F.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, K.G. Grell, J. Guglielmi, A. Hager, K. Hantke, V. Hemleben, U. Henning, G. Jung, W. Löffler, D. Mecke, C. Meier-Brook, F. Oberwinkler, K. Pelling, K. Poralla, H. Probst, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, H. Schwarz, B. Schwemmle, H.U. Seitz, U. Seitz, W. Seyffert, M. Siess, J. Strähle, G. Weitzel, G. Winkelmann, P. Wenk, H. Zähner

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 06151/27800